



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AS CÉLULAS IPS E O SEU USO NA CONSTRUÇÃO DE MODELOS CELULARES DE  
DOENÇAS HUMANAS**

Trabalho submetido por  
**Catarina Alexandra Pereira da Silveira e Sousa de Andrade**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Outubro de 2015**



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **AS CÉLULAS IPS E O SEU USO NA CONSTRUÇÃO DE MODELOS CELULARES DE DOENÇAS HUMANAS**

Trabalho submetido por  
**Catarina Alexandra Pereira da Silveira e Sousa de Andrade**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Evguenia Bekman**

**Outubro de 2015**



## AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado, apesar de ser um processo solitário, comporta sempre apoios e incentivos que tornam esta etapa exequível.

Agradeço à Coordenadora do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Doutora Perpétua Gomes, bem como a todos os professores que o tornaram possível, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este curso que contribuiu muito para a minha formação académica e científica.

Agradeço à minha orientadora, Doutora Evguenia Bekman, pelo saber que me transmitiu, pelas opiniões e críticas, total apoio e colaboração em todas as etapas deste percurso. Agradecer também por ter sido uma óptima Professora e por me ter introduzido a este tema.

Agradeço às minhas amigas e colegas, Ana Barroco, Marta Domingos, Andreia Rodrigues, Margarida Rocha, Verónica Faria, que sempre estiveram ao meu lado nesta fase, pela força e apoio que transmitiram. Não só na faculdade, foram todas umas óptimas amigas e parceiras.

Agradeço aos meus mais antigos amigos, Carolina, Francisco, Inês, Guilherme, Leonor, Bárbara, Mariana entre outros que não menciono o nome mas sabem que fazem parte desta lista, que sempre acreditaram que seria possível e sempre me ajudaram a ultrapassar todos os obstáculos.

Por último e não menos importante, à minha família, especialmente aos meus pais e à minha irmã, que sem eles nada disto poderia ter sido possível. Por toda a paciência, apoio, incentivo e coragem que todos os dias, nos últimos cinco anos me transmitiram.

Os meus sinceros agradecimentos a todos os que dispensaram o seu tempo para que eu alcançasse esta meta!



## RESUMO

Nesta dissertação será feita uma análise geral da literatura sobre as células estaminais, nomeadamente sobre as células estaminais pluripotentes induzidas (iPS) e as suas aplicações em modelos celulares humanos, dado o papel fulcral que têm representado para os avanços e usos possíveis, ao nível da evolução científica.

As células iPS são células somáticas que foram reprogramadas para um estado de pluripotência através da introdução de um cocktail específico de factores de transcrição. Estas células podem ser obtidas por reprogramação directa a partir de células fisiologicamente diferentes, como os fibroblastos, queratinócitos, hepatócitos e células do sangue. Elas apresentam similaridade com as células estaminais embrionárias nas propriedades morfológicas e de crescimento bem como de expressão de genes específicos de células estaminais embrionárias. Ambos crescem em clusters, expressam marcadores de pluripotência, e formam teratomas quando injectados nos animais imunocomprometidos, o que demonstra o seu potencial de diferenciação em linhagens celulares das três camadas germinativas embrionárias, incluindo neurónios, células do sangue e células cardíacas.

Os progressos na área das células iPS revelaram o seu imenso potencial numa panóplia de aplicações, como a modelação de desenvolvimento individual e dos mecanismos de regeneração, até ao transplante celular, a descoberta de novos fármacos, a identificação dos mecanismos de doenças e o seu tratamento.

Contudo, existe ainda uma marcante divergência de opinião, assente em pontos de vista eticamente diferentes sobre a segurança destas células e os inerentes problemas que podem ter os estudos e ensaios. No entanto, com o evoluir da segurança e do conhecimento, baseando-se nos primeiros ensaios clínicos já realizados, começa a ser visível a evolução exponencial das suas aplicações.

Palavras-chave: Células iPS, reprogramação, modelo de doença, medicina regenerativa

## ABSTRACT

In this dissertation will be presented a general review of the literature on stem cells, in particular on induced pluripotent stem cells (iPS) and their applications in human cell models, given the key role that these cells represent to the progress and also due to the wide range of uses in diverse fields of science.

The iPS cells are somatic cells that have been reprogrammed to a state of pluripotency through the introduction of a specific cocktail of transcription factors. These cells may be obtained by direct reprogramming from physiologically different cells, such as fibroblasts, keratinocytes, hepatocytes and blood cells. They present similarity to embryonic stem cells in morphology and growth properties, as well as in expression of specific genes of embryonic stem cells. Both cell types grow in clusters, express markers of pluripotency and form teratomas when injected into immunocompromised animals, thus demonstrating their potential to differentiate into cell lineages of all three embryonic germ layers, including neurons, cardiac cells and blood cells.

Progress in the field of iPS cells revealed their potential in a range of applications, such as modeling of individual development and mechanisms of regeneration to the cell transplantation, the discovery of new drugs, the identification of disease mechanisms and its treatment.

However, there is still a marked divergence of opinion, based on ethically different views on the safety of these cells and on the problems inherent to the studies and trials of these cells. With the evolution of our knowledge of these cells and of the security of their use, as supported by the early clinical tests already carried out, one can envisage the exponential evolution of applications for these remarkable cells.

**Keywords:** iPS Cells, reprogramming, disease model, regenerative medicine

## ÍNDICE

Índice de figuras.....	8
Índice de tabelas.....	9
Lista de abreviaturas .....	11
1 Introdução.....	13
1.1 Células estaminais .....	10
1.2 Origem e fonte de estaminalidade .....	16
1.3 Questões éticas .....	19
1.4 Evolução histórica .....	21
2 Reprogramação.....	23
3 As células iPS .....	27
3.1 Características e origem.....	27
3.2 Metodologia.....	31
4 Aplicação das células iPS .....	37
4.1 Modelos de doenças com células iPS .....	39
4.2 Pesquisa de fármacos.....	44
4.3 Terapias celulares .....	48
5 Perspectivas futuras .....	53
6 Conclusão .....	59
7 Bibliografia.....	61



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aplicações gerais das SC. ....	15
Figura 2: Caracterização das células estaminais embrionárias.....	17
Figura 3: Memória epigenética em células iPS .....	24
Figura 4: Vias de sinalização de sinalização de células ES.....	28
Figura 5: O Circuito de aplicação das células iPS.....	30
Figura 6: Geração de células iPS a partir de fibroblastos utilizando FTs.....	31
Figura 7: Reprogramação de células somáticas em células iPS utilizando retrovírus contendo quatro FT.....	33
Figura 8: Aplicações das células iPS usando células somáticas de um indivíduo .....	38
Figura 9: A utilização das células iPS na cardiomiopatia diabética .....	45
Figura 10: As aplicações das células iPS, nomeadamente a terapia de reposição celular com células iPS derivadas .....	49
Figura 11: Uso das células iPS no tratamento da Anemia Falciforme. ....	50
Figura 12: Aplicações da tecnologia das células iPS onde se pode esperar maior impacto .....	54
Figura 13: Aplicação das células iPS em três fases diferentes de ensaios clínicos .....	57

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Modelos de doença publicados recorrendo à tecnologia das células iPS.....	34
---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

BMP – Bone Morphogenic protein, Proteína Morfogénica Ossea

CE - Carcinoma Embrionário

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DMD - Distrofia Muscular Duchenne

DNA – Deoxyribonucleic Acid, Ácido Desoxirribonucleico

EBV - Epstein- Barr Vírus

ES – Embryonic Stem, Células Estaminais Embrionárias

bFGF – basic Fibroblast growth factor

FT - Factor de Transcrição

iPS – Induced Pluripotent Stem, Célula Estaminal Pluripotente Induzida

hiPS - Human induced Pluripotent Stem, Célula Estaminal Pluripotente Induzida Humana

LIF – Leukemia Inhibitory Factor, Factor de Inibição de Leucemia

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase, Proteína Cinase Activada por Mitogénio

PSC – Pluripotent Stem Cells, Células Estaminais Pluripotentes

iRNA – Ribonucleic Acid Interference, Ácido Ribonucleico de Interferência

SC – Stem Cells, Células Estaminais

TALEN - Transcription Activation-Like Effector Nucleases

TGF- $\beta$  – Transforming growth factor beta

ZNF - Zinc Finger Nucleases



## 1 INTRODUÇÃO

Nesta dissertação será feita uma análise geral da literatura sobre as células estaminais, nomeadamente sobre as células estaminais pluripotentes induzidas (iPS) e as suas aplicações em modelos celulares humanos, dado o papel fulcral que têm representado para os avanços e usos possíveis, ao nível da evolução científica.

Marcada por uma abordagem compreensiva e analítica, nesta dissertação procura-se quer um enquadramento e uma articulação dos enunciados empíricos, quer uma análise dos enunciados teóricos disponíveis. Além de analisar a pertinência e a aplicabilidade dos enunciados teóricos procura-se, primordialmente, explorar as perspectivas oferecidas, mediante uma análise combinada destes enunciados na verificação, ante o objectivo apresentado.

Discorrendo e agregando os enunciados das publicações e artigos na área das células estaminais, nomeadamente das células iPS, atende-se às propostas teóricas que permitem a apreciação da concepção, que se segue, analisando-se as teorizações que permitem a observação da hipótese de investigação e dos vectores caracterizadores da natureza das células iPS e reflecte-se sobre a literatura específica a respeito do objecto de estudo definido para o efeito.

## 1.1 CÉLULAS ESTAMINAIS

As células estaminais são células consideradas não diferenciadas, capazes de se dividir indefinidamente de forma simétrica ou assimétrica. Assim sendo, considerando uma hierarquia do potencial de diferenciação em linhagens diversas, destaca-se a capacidade de totipotência, pluripotência e multipotência. O potencial destas células assenta nas suas três propriedades base: a capacidade de auto-renovação, de diferenciação em linhagens múltiplas e, em último, a restituição funcional após transplante, que se destaca por ser a mais difícil de demonstrar (Totey, Pal, Mamidi, Govindasamy, & Totey, 2010).

O potencial de totipotência permite a obtenção de linhagens embrionárias e extra-embrionárias, como por exemplo o zigoto, enquanto que, células com pluripotência apenas tem capacidade de originar três camadas germinativas, a endoderme, a ectoderme e a mesoderme, não tendo capacidade de originar linhagem extra-embrionária. Por fim a multipotência significa capacidade de originar linhagens diferentes a partir de uma camada germinativa (Totey et al., 2010).

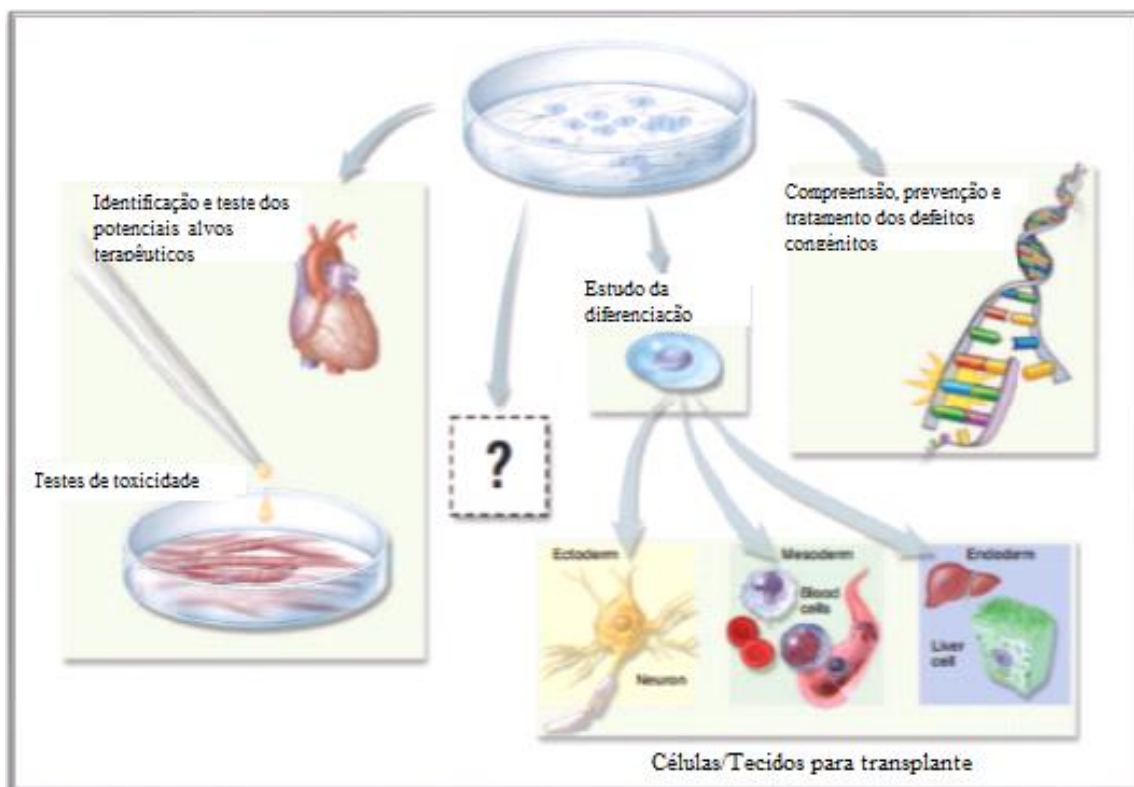


Figura 1: Aplicações gerais das SC.

Adaptado

de

[http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative\\_Medicine\\_2006.pdf](http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative_Medicine_2006.pdf)

Por conseguinte, a capacidade das células estaminais de diferenciação em diferentes tipos de células permite a sua aplicação em diversos campos como por exemplo, em testes que podem melhorar a segurança e eficácia de medicamentos de uso humano, em testes de toxicidade, mas também na prevenção de tratamento de doenças à nascença e ainda em transplantes de tecidos (Figura 1).



## 1.2 ORIGEM E FONTE DE ESTAMINALIDADE

No decorrer da embriogénese é observada uma diminuição do potencial de diferenciação das células que constituem o embrião. Assim o zigoto e os blastómeros, células da mórula entre as duas e as oito semanas, são as únicas com capacidade de totipotência. No blastocisto inicia-se uma especialização das células, com a perda progressiva da capacidade de se diferenciarem em todo o tipo de células. No entanto, o blastocisto tem na sua composição as células externas do trofoblasto e uma cavidade denominada blastocélio, que num dos polos apresenta uma massa celular, o botão embrionário. Assim sendo, as células do trofoblasto apenas originam células dos tecidos extra-embrionários como a placenta, o corion e o saco amniótico, enquanto que as células do botão embrionário vão ser precursoras do epiblasto, de onde derivam as três camadas germinativas do embrião (ectoderme, mesoderme e endoderme), com capacidade de pluripotência, contendo células estaminais embrionárias ES, que podem gerar todo o tipo de células do organismo adulto, excluindo a placenta e tecidos extra-embrionários (Figura 2). Só a estrutura completa suporta o desenvolvimento completo de um indivíduo (José Bragança, 2010).

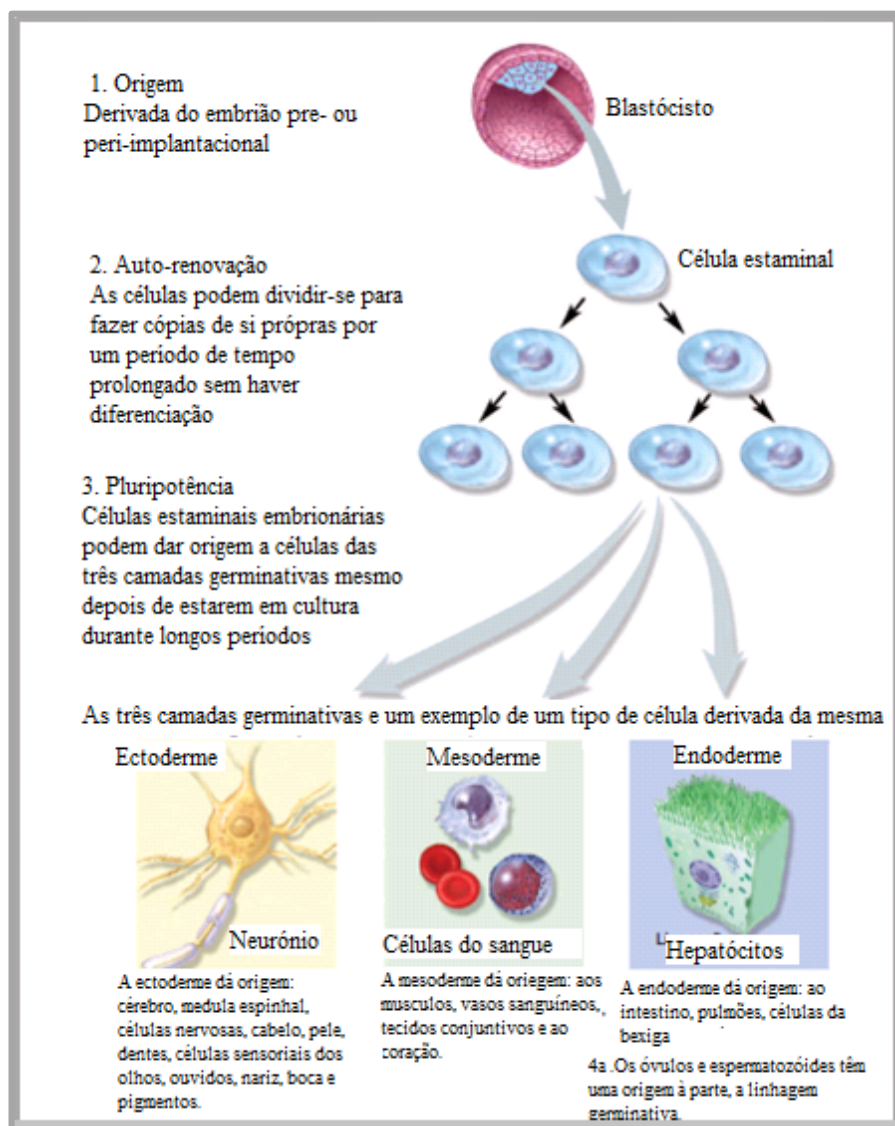


Figura 2: Caracterização das células estaminais embrionárias.

Adaptado de

[http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative\\_Medicine\\_2006.pdf](http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative_Medicine_2006.pdf)

As células estaminais não existem apenas durante a embriogénese, mas também em vários tecidos e órgãos do indivíduo adulto, sendo designadas como células estaminais adultas. Tal como o nome pressupõe, estas têm capacidade de auto-renovação bem como de diferenciação em células específicas dos tecidos ou órgãos onde se localizam (Lerou & Daley, 2005) como por exemplo, no baço e no fígado. Estas células são responsáveis pela manutenção e reparação dos tecidos onde se encontram, apesar da sua capacidade de diferenciação em relação as células ES ser mais reduzida (Leeper, Hunter, & Cooke, 2010).

A manutenção das células ES requer um balanço que tem em conta a memória celular, que especifica a capacidade de pluripotência; e a plasticidade, que permite a entrada em qualquer via de diferenciação. A estaminalidade pressupõe, então, uma desrepressão global da expressão génica ao nível da cromatina, através da regulação epigenética.

Regulação epigenética engloba modificações da cromatina e DNA, contudo não ocorre mudança na sequência de DNA. Esta regulação ocorre através de alterações a nível da metilação do DNA, das histonas e de RNA de interferência. A remodelação da cromatina pode ser iniciada por dois mecanismos: modificações pós- traducionais dos aminoácidos das histonas, como a acetilação, metilação e ubiquitinação; ou por adição de grupos metil ao DNA, nos locais CpG, convertendo citosina e 5- metilcitosina (Goldberg, Allis, & Bernstein, 2007).

Outras modificações epigenéticas são mediadas pelo mecanismo de RNAi e consistem em silenciamento de genes pós-transcricional (PTGS).

### 1.3 QUESTÕES ÉTICAS

No nicho das células estaminais, dentro do corpo humano, a sua abundância é muito baixa para a utilização ser facilitada e consequentemente para um bom aproveitamento para futuras investigações (Greiner et al., 2014).

O possível desenvolvimento de terapias celulares, investigações e ensaios baseado na utilização destas células é bastante legislado, não deixando de parte as questões éticas e morais relacionadas.

Diversas opiniões sobre a ética neste sector da ciência giram em torno de uso de células estaminais embrionárias implicar a destruição de embriões humanos, interferindo assim com uma possível futura vida humana. Ainda assim, diversas ideias existem acopladas a crenças religiosas, deixando para trás a argumentação científica. Actualmente, a revisão e criação de leis já têm em conta a parcela científica. Contudo, não só os aspectos éticos importam neste tema, também os interesses económicos e histórico-culturais estão postos sobre a mesa. Nos debates políticos e éticos a crescente expectativa económica inerente às possíveis terapias derivadas do uso terapêutico das células estaminais têm constituído um grande peso nos avanços dos estudos nesta área (Pompe, Bader, & Tannert, 2005).

Não obstante, a constante evolução, também, tem permitido que os argumentos científicos sejam cada vez mais fortes e convincentes. Contudo a maioria dos opositores são bastante motivados devido à destruição de embriões humanos, mesmo por meios legais, para futuras investigações (Eggleston, 2012).

As questões éticas continuam a constituir uma dificuldade, não só pelo acima referido, como também pela possível rejeição de tecidos após transplante. A geração de células pluripotentes induzidas a partir de células do paciente constitui então uma forma de ladear o problema. Todavia, em 2009, a Food Drug Administration (FDA), permitiu a realização do primeiro ensaio clínico, a cargo da Geron Corporation, com a utilização de células estaminais humanas, com o intuito de tratar pacientes com lesões da medula espinal.

Em 2012, Eggleston fez uma revisão dos dados experimentais sobre o potencial terapêutico das células estaminais em terapias regenerativas em três patologias, bem como a avaliação de factores relevantes para este assunto como o financiamento limitado para a investigação biomédica, hipóteses de discordância na medicina evolutiva, entre outros. O potencial terapêutico destas células já é aceite e reconhecido. Não obstante as

categorias de opiniões continuam a ser muito heterogêneas. Por exemplo, no que diz respeito à análise dos dados experimentais feita ao potencial terapêutico das três patologias, nomeadamente, lesões na medula espinhal, diabetes tipo um e doença cardiovascular, tem sido complexa e inconclusiva.

A investigação das células estaminais continua a ser para grande parte da comunidade científica um caminho promissor para a redução do sofrimento e da morte prematura, contudo a divergência de opinião continua a ser muito grande (Eggleson, 2012).

Existem outras aplicações que envolvem o uso das células estaminais como os materiais biocompatíveis que também são abordados na dicotomia aceitar/rejeitar as investigações e possíveis terapias baseadas em células estaminais.

O aumento da disponibilidade deste tipo de materiais biológicos, acelerada pela revolução da nanotecnologia também é uma ótima perspectiva para a engenharia regenerativa, integrando a proteção das reacções do sistema imunológico, no organismo. Esta solução é importante, visto depois de compreendido o processo regenerativo natural, poder ser usada como uma intervenção terapêutica (Eggleson, 2012).

No último mês do ano passado, foi aprovado na União Europeia a primeira terapia com células estaminais, o Horoclar, o que mostra que cada vez mais esta área está em expansão e o doente está cada vez mais a ser posto em primeiro lugar, de modo a criar o melhor para o seu tratamento.

## 1.4 EVOLUÇÃO HISTÓRICA

Antes da descoberta das células estaminais, em 1964, Kleinsmith e Pierce isolaram um tipo de células a partir de um carcinoma embrionário, denominando-as células do carcinoma embrionário. Este carcinoma enquadra-se na categoria de tumores de células germinativas, como os teratocarcinomas. Os teratocarcinomas têm capacidade de formar derivados dos três folhetos germinativos, enquanto que as células do carcinoma embrionário, tal como o blastócisto, formam estruturas tubulares primitivas, assemelhando-se a um embrião precoce (Kleinsmith & Pierce, 1964).

Estas células do carcinoma apresentavam uma semelhança morfológica, um potencial diferenciativo e a capacidade de pluripotência, com as células do blastócisto. Porém, estas células, devido a sua capacidade de formarem cariótipos anormais e ao facto de permitirem a acumulação de mutações no decorrer do desenvolvimento, não podiam ser consideradas células estaminais verdadeiras (Kleinsmith & Pierce, 1964).

Foi na década de oitenta, com o trabalho de duas equipas em paralelo que se estabeleceram culturas *in vitro* de células pluripotentes derivadas a partir de embriões de murganho. Os fibroblastos embrionários foram usados como suporte para as células de blastocisto. Assim as células ES que derivam da massa interna do blastócisto do murganho, adquiriam capacidade de crescerem indefinidamente, mantendo a predisposição para a pluripotência e diferenciação em células das três camadas germinativas (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981).

Com a evolução científica da última década do século passado, em 1998, que se isolaram as primeiras células estaminais embrionárias humanas (Shamblott et al., 1998; Thomson et al., 1998) e os problemas éticos inerentes a este assunto começaram a surgir.

Deste modo as discordâncias sobre este tema surgiram em grande parte devido ao facto das ES humanas serem isoladas a partir de embriões humanos. As fontes habituais de ES são as linhas de células ES, os embriões excedentários das clínicas de fertilização *in vitro*, os embriões gerados para a investigação por fertilização *in vitro* ou clonagem terapêutica (Kazutoshi Takahashi & Yamanaka, 2006). O passo seguinte foi dado em 2006, quando foi publicado por Takahashi e Yamanaka o estudo onde se obtiveram as células denominadas induced pluripotent stem cells, iPS, obtidas a partir de fibroblastos, primeiro de murganho e no ano seguinte, humanos. Esta publicação revolucionou toda a área das células estaminais, desencadeando um boom de investigações.

As conquistas vieram sempre a evoluir e foi em 2012 que a Assembleia Nobel, composta por 50 professores do Instituto Karolinska, decidiu a atribuição do Prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina conjuntamente aos John B. Gurdon (pelo seu trabalho pioneiro de transferência de núcleos em 1958) e Shinya Yamanaka pela descoberta de que células somáticas diferenciadas podem ser reprogramadas para o estado de pluripotência.

## 2 REPROGRAMAÇÃO

John B. Gurdon foi o primeiro a demonstrar que o núcleo de uma célula somática pode sofrer reprogramação ao ser transferido para o oócito enucleado, e desta forma dar origem a um novo ser (Gurdon, 1958).

Anos mais tarde, a descoberta do Gurdon serviu de base para gerar o primeiro mamífero clonado, a ovelha Dolly (Wilmut, Schnieke, McWhir, Kind, & Campbell, 1997). O mesmo fenómeno de reprogramação foi conseguido por fusão de células somáticas com as ES (Tada, Takahama, Abe, Nakatsuji, & Tada, 2001).

Foi à já dezoito anos que nasceu o primeiro mamífero clonado, a Dolly, e foi esta ovelha que preconizou a produção de animais através da clonagem, provando assim a possibilidade de alterar o estado epigenético de um núcleo diferenciado pelo oócito enucleado (Wilmut et al., 1997).

Todos estes avanços científicos permitiram que se soubesse que os ovos não fertilizados e as células ES contêm factores que têm capacidade para conferir um estado de totipotência ou pluripotência. Posto isto, estes factores desempenham um papel importante na identidade das células ES e na indução da pluripotência das células somáticas.

Em 2006, a equipa de Yamanaka provou que não existe apenas um factor capaz de permitir a reprogramação genética, mas sim uma combinação de quatro factores de reprogramação, Oct4, Sox2, KLF4 e c-Myc. Com este cocktail é então possível induzir um estado de pluripotência em células somáticas de mamíferos. Às células obtidas desta maneira foi dado o nome de células estaminais pluripotentes induzidas, iPS. Estas células podem ser geradas directamente a partir de culturas de fibroblastos e com a adição dos factores de reprogramação (a saber: Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, OSKM) (K Takahashi et al., 2007; Kazutoshi Takahashi & Yamanaka, 2006).

Actualmente sabe-se que reprogramação é um processo gradual que pode demorar entre dias a semanas e que está dependente da cascata de genes que tem de ser reactivada tendo em conta o tipo de célula somática em questão. Parte substancial da informação epigenética que a célula tem que ser apagada e reconstituída de novo, tendo em conta que as células iPS não conseguem re-estabelecer o estatuto epigenético original.



Os diversos tipos de células do organismo têm epigenomas individuais, isto é, um determinado conjunto de modificações pós-traducionais de histonas covalentes, metilação do DNA e ainda outras modificações epigenéticas que são mediadas pelo mecanismo de iRNA. A combinação destes fenômenos leva a uma única estrutura de cromatina, durante o processo de diferenciação e especialização celular (Vaskova, Stekleneva, Medvedev, & Zakian, 2013).

Conquanto as células iPS têm demonstrado que podem ter algumas características específicas, que podem adquirir durante o processo de reprogramação ou ainda podem ser restos de epigenomas e transcriptomas do tecido dador (Figura 3), mais conhecido como memória epigenética (Vaskova et al., 2013).

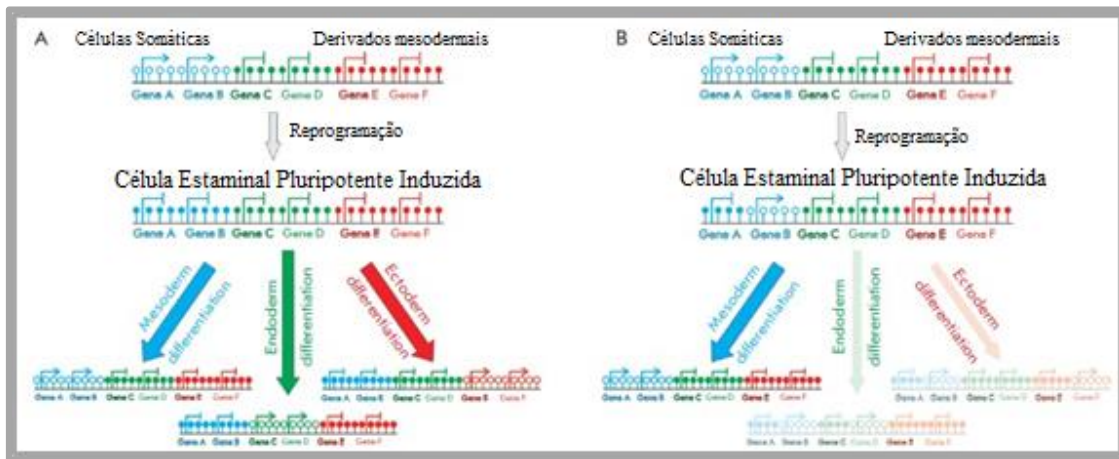


Figura 3: Memória epigenética em células iPS. A- Processo “ideal” de reprogramação de células somáticas para pluripotência, em cada uma das camadas germinativas. B- O resultado da reprogramação de células iPS quando retêm algumas características do epigenoma do tecido dador, deslocando a posterior diferenciação, preferencialmente para o tipo de célula somática do dador.

Adaptado de Vaskova et al., 2013

Assim sendo a reprogramação de células somáticas para células iPS necessita de profundas alterações epigenéticas. Desta forma no decorrer da reprogramação, uma alteração na estrutura da cromatina repõe a expressão do gene e estabiliza a auto-renovação. Este processo é considerado muito ineficiente, em grande parte devido às múltiplas barreiras epigenéticas. Este capítulo da reprogramação está a ser muito investigado de modo a melhorar a produção das células iPS (Gładych, Andrzejewska, Oleksiewicz, & Estécio, 2015).

A reprogramação pode ser atingida por transferência do núcleo somático com oócito enucleado (GURDON, 1962), fusão de célula somática com estaminal e expressão forçada com FTs (Takahashi & Yamanaka, 2006).



### 3 AS CÉLULAS iPS

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS E ORIGEM

As células estaminais pluripotentes induzidas (iPS), podem ser definidas como células diferenciadas que foram experimentalmente reprogramadas em células estaminais embrionárias, ou seja, passaram a apresentar as propriedades morfológicas e de crescimento bem como expressão de genes característicos de células estaminais embrionárias (ES). À semelhança das células ES, as células iPS podem ser propagadas indefinitivamente em cultura, em condições que permitem a manutenção de pluripotência. Estas condições para as células pluripotentes de murganho são: activação simultânea das vias de sinalização LIF e BMP, que servem para activar a transcrição dos genes de pluripotência, Nanog, Oct4 e Sox2 e inibir a saída para diferenciação através da activação da expressão das proteínas Id (inibidores de diferenciação) (Figura 4).

Devido às diferenças entre as células ES das diversas espécies foi necessário encontrar condições de cultura diferentes para as células humanas, visto estas usarem vias de sinalização distintas para manter a pluripotência. Contudo, as ES humanas e murinas exibem os perfis de expressão genética semelhantes, bem como as redes de factores de transcrição e a actividade de factores de transcrição (como Oct4, Sox2 e Nanog) (Han, Wang, & Hao, 2013).

Assim no caso das ES humanas, estas não devem ser expostas ao LIF e ao BMP, visto que estes factores provocam a sua diferenciação. A via de auto-renovação é activada pela eliminação da sinalização do indutor de diferenciação pelo activador do mitogénio da proteína cinase, MAPK (Ying et al., 2008).

Para as células ES humanas manterem a capacidade de auto-renovação é então necessário bFGF, TGF- $\beta$ , activina e a via de sinalização Nodal (Han, Wang, & Hao, 2013). O bFGF desempenha a função de regulação da expressão dos ligandos de TGF que promovem a auto-renovação das células ES humanas bem como a supressão da via de sinalização de BMP (Greber, Lehrach, & Adjaye, 2007; Xu et al., 2002).

Esta última via de sinalização é responsável por induzir a diferenciação das ES humanas, daí ser muito importante que esta seja inibida. Veio substituir o FBS, isto é, o soro fetal bovino, anteriormente utilizado para a manutenção do estado de pluripotência em

conjunto com o LIF. A utilização deste soro tinha desvantagens como a variabilidade de lote, ser um produto de origem animal e ainda ter por ter uma composição indefinida.

Quanto à activina, esta induz bFGF, que por sua vez induz o TGF-  $\beta$  e que antagoniza BMP e inibe BMP4, quer em células embrionárias humanas quer utilizando LIF ou fibroblasto (Greber et al., 2007).

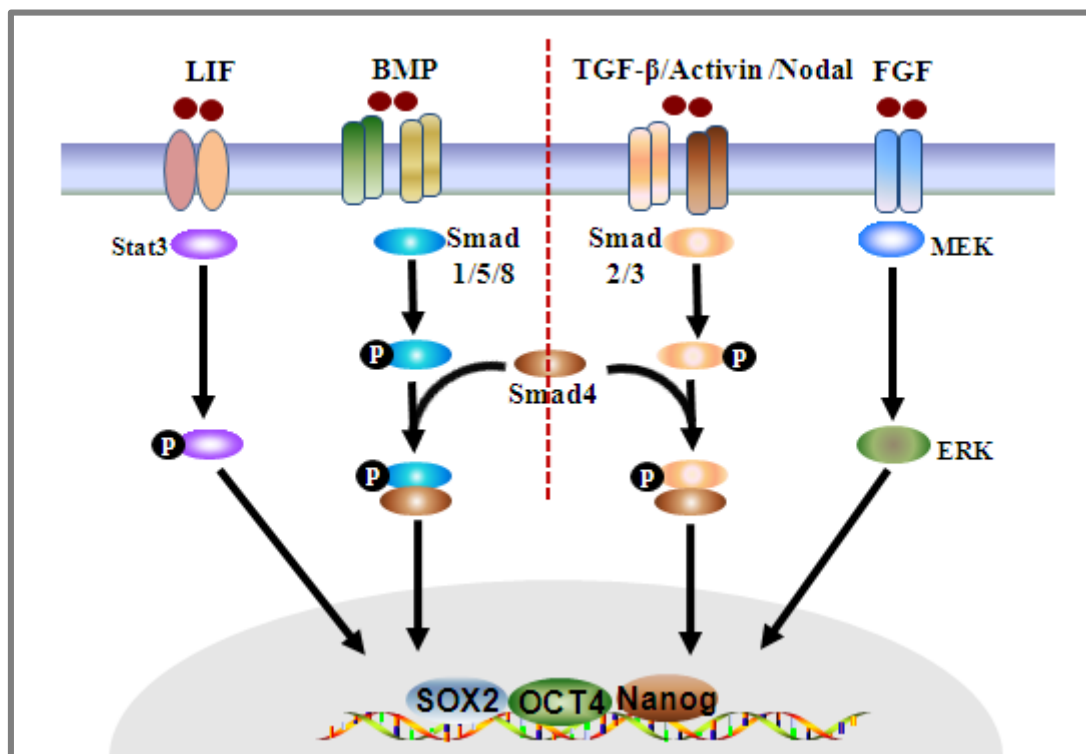


Figura 4: Vias de sinalização de células ES para manter a sua pluripotência. Em cultura, as células ES necessitam de factores de crescimento extrínsecos. Estes factores actuam em diferentes vias de sinalização de modo a regular a transcrição intrínseca e permitir que as células ES permaneçam no estado de indiferenciação. As vias de sinalização são diferentes dos ratos (lado esquerdo da imagem) para os humanos (lado direito da imagem). Os membros de TGF-  $\beta$ , através da sua ligação ao receptor, vão activar as proteínas intracelulares Smad. As smad 2 e 3 são activadas especificamente por ligandos Nodal, Activina e por TGF, enquanto as smad 1 e 5 são activadas por ligandos BMP. Estas proteínas deslocam-se para o núcleo de modo a regular a expressão dos genes alvo. Quanto FGF é responsável pela activação de várias cascatas de sinalização destacando MAPK (o MEK faz parte desta cascata) entre outras.

Adaptado de (Han et al., 2013)

Foram, então definidas condições, onde se combinaram três inibidores (3i), cujos alvos são o receptor do FGF, cinase MEK e GSK3 estabelecendo as condições para a derivação eficiente e propagação indefinida de células ES funcionais (Ying et al., 2008).

As células iPS apresentam, assim, uma grande semelhança com a ES, partilhando as características típicas de pluripotência. Em ensaios feitos em roedores onde foram comparadas as células iPS às células ES as semelhanças são significativas (Daley et al., 2009; Ellis et al., 2009).

As hiPS foram consideradas similares às células ES, visto que ambas crescem como colónias, expressam marcadores de superfície e nucleares de pluripotência destacando-se TRA-1-60, TRA-1-80, SSEA-3, SSEA-4, Oct4, Sox2 e Nanog, formam teratomas quando injectados em tecidos animais imunocomprometidos, o que mostra o seu potencial de diferenciação em três camadas germinativas embrionárias (Takahashi et al., 2007).

Esta primeira reprogramação foi pioneira de muitas outras. Contudo foi em 2007, que Takahashi et al. e Yu et al., geraram as primeiras células iPS humanas a partir de fibroblastos, usando duas combinações de factores diferentes, a OSKM no primeiro caso e Oct4, Sox2, Nanog e LIN28 no segundo. Mais uma vez comprovou-se que as células obtidas se comportam como células ES mesmo utilizando um cocktail diferente do já testado (K Takahashi et al., 2007).

A estas células de produção laboratorial está associado um estado de estaminalidade embrionária sem recorrer às habituais fontes como as linhas de células ES, embriões excedentários das clínicas de fertilização *in vitro*, embriões gerados para a investigação por fertilização *in vitro* ou clonagem terapêutica (Kazutoshi Takahashi & Yamanaka, 2006).

A descoberta das células iPS foi rapidamente transposta para fibroblastos humanos, que foi então precursora de uma imensa quantidade de estudos que foram iniciados, de modo a testar a produção de células pluripotentes induzidas através de outro tipo de células, como as células  $\beta$  do pâncreas (Stadtfield, Brennand, & Hochedlinger, 2008), células estaminais neurais (J. B. Kim et al., 2008), células do estômago e fígado (Aoi et al., 2008), melanócitos (Utikal, Maherali, Kulalert, & Hochedlinger, 2009), queratinócitos (Maherali et al., 2008) entre outras.

Estas células têm potencial de aplicações em diversas áreas, como será explicado com mais detalhe à frente no texto, contudo destaca-se o possível uso em medicina regenerativa, pesquisa de fármacos, modelos de doenças e testes de toxicidade (Figura 5) (Robinton & Daley, 2012).

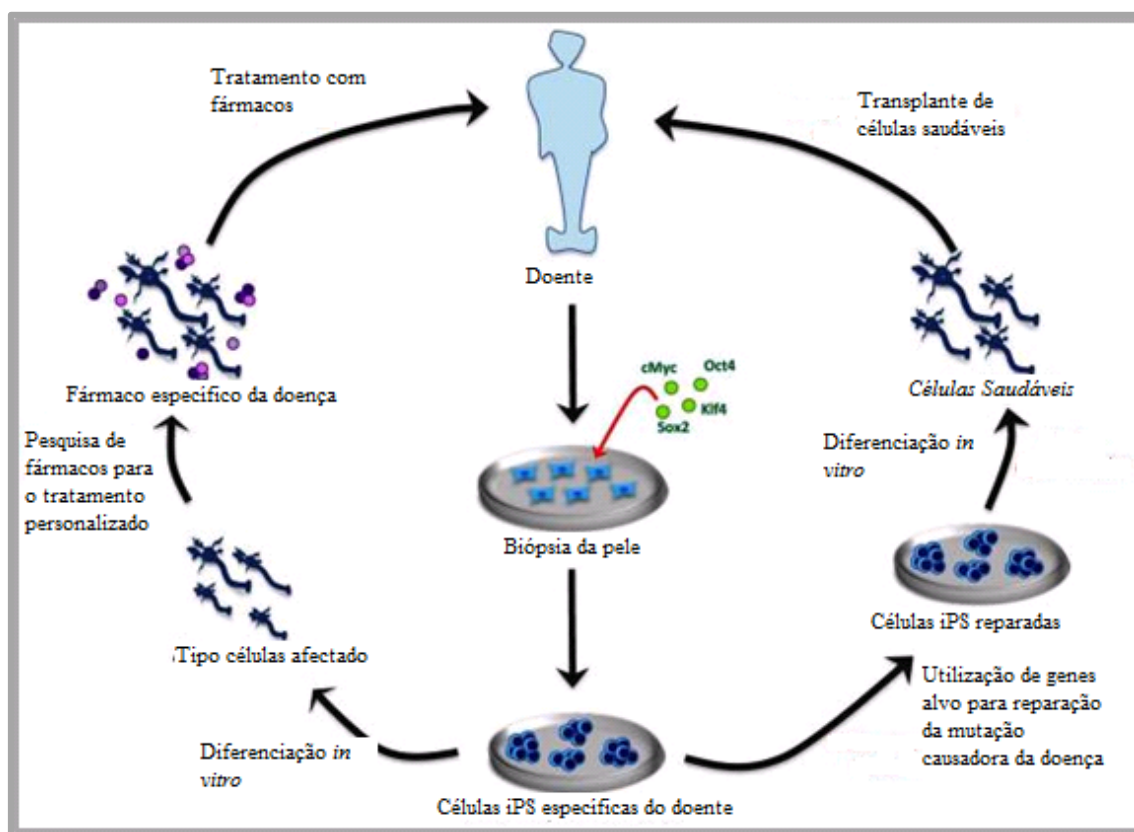


Figura 5: O Circuito de aplicação das células iPS. O Circuito de aplicação das células iPS derivadas do paciente através de uma biópsia e reprogramadas com FT, para poderem ser usadas para produção de células e transplantes ou para diferenciação celular de modo a obter um modelo para fazer uma pesquisa de fármacos e posteriormente tratar o doente com uma terapêutica mais adequada.

Adaptado de Robinton & Daley, 2012.

### 3.2 METODOLOGIA

A primeira técnica descrita para reprogramar e induzir pluripotência em células somáticas foi proposta por Takahashi e Yamanaka em 2006. Neste trabalho inicial foram identificados vinte e quatro genes que codificam FTs potencialmente capazes de funcionar como factores de indução de pluripotência, por desempenharem um papel crucial na manutenção da identidade celular de ES, bem como na indução de pluripotência em células somáticas como já referido (Kazutoshi Takahashi & Yamanaka, 2006). Através da eliminação sistemática dos FTs que não eram essenciais ao processo de reprogramação esta equipa chegou, então, à conclusão que apenas quatro dos vinte e quatro factores de transcrição iniciais são necessários para obtenção de células pluripotentes induzidas. A sua acção leva a uma reversão geral do epigenoma somático para um estado que se assemelha ao das ES, tanto nos fibroblastos embrionários de murganhos, como em fibroblastos adultos humanos, atingida através de uma transdução retroviral com os factores Klf3, Oct4, Sox2 e c-Myc (Figura 6).

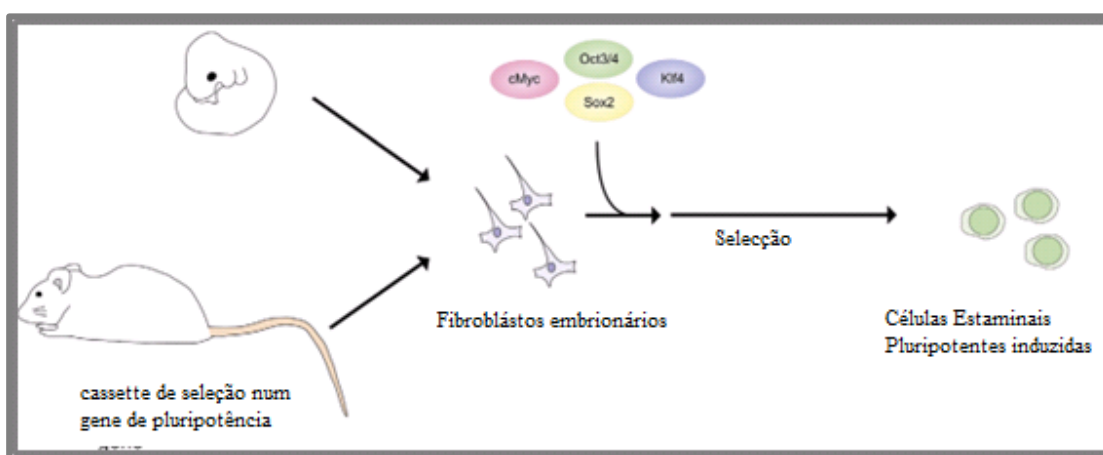


Figura 6: Geração de iPS a partir de fibroblastos utilizando FTs.

Adaptado de Lewitzky & Yamanaka, 2007

Assim sendo, o FT Sox2, SRY-type high mobility group box 2 é crucial para o desenvolvimento embrionário e está envolvido na manutenção de células ES, assim como na diferenciação destas em linhagem neural. O Sox2 pode cooperar com outros FTs como o Oct4 ou o Nanog, activando a sua transcrição. Quanto ao FT KLF4, este pode actuar como um oncogene, bem como uma proteína supressora de tumor. O KLF4 conjuntamente com o c-Myc e o STAT3 é um alvo na via de sinalização do LIF e a sua sobre-expressão inibe a diferenciação das ES. O KLF4 pode ainda estar envolvido na repressão do p53, um regulador negativo de Nanog (Lewitzky & Yamanaka, 2007).



Quanto ao FT Oct4 é este responsável pela manutenção da pluripotência, sendo a sua actividade na reprogramação exclusiva apesar de se enquadrar numa família de genes grande.

Por último, o FT c-Myc, da família de fatores helix-loop-helix, participa na sinalização do receptor de LIF como um efector ajusante de STAT3. É ainda, um substrato para a GSK3b (Lewitzky & Yamanaka, 2007). Na produção de células iPS, o c-Myc pode ter um efeito compensatório ao do KLF4, visto este ter um efeito anti-proliferativo uma vez que suprime o p53. O p53 sugere uma ligação funcional entre a supressão do tumor e de reprogramação (Deng & Xu, 2009).

Posteriormente, percebeu-se que a reactivação do c-Myc retroviral aumenta a probabilidade de surgirem tumores em quimeras e na sua descendência, ainda que para aplicações clínicas, o uso deste FT deva ser evitado (Okita, Ichisaka, & Yamanaka, 2007).

Devido aos factos a cima descritos, o c-Myc já não faz parte dos protocolos de reprogramação. Decorrente disto, apareceram diferenças entre os resultados, com destaque para a redução da quantidade de células produzidas, bem como o aumento da consistência da qualidade das células iPS (Nakagawa et al., 2008).

O primeiro protocolo descrito utiliza, como atrás referido, a indução de pluripotência por retrovírus. Contudo esta técnica apresenta algumas limitações tal como a utilização de lentivírus também. Assim pode potencializar a indução de mutação por inserção, destacando-se o risco de reactivação do transgene durante a diferenciação das células iPS, podendo afectar a identidade das linhagens celulares e derivado (Yu, Chau, Vodyanik, Jiang, & Jiang, 2011).

No entanto, existem outros vectores descritos, que podem ser usados na reprogramação, destacando-se a transfecção não viral, com proteínas citoplasmáticas, o mRNA e o miRNA. Paralelamente, foram identificadas moléculas que por estarem envolvidas na reprogramação epigenética das células somáticas, permitindo que a reprogramação seja otimizada, mesmo utilizando vírus, criando, assim, iPS sem sequências transgénicas no seu genoma.

A utilização de retrovírus pela equipa de Takahashi and Yamanaka foi descrita como tendo uma eficiência razoável. Todavia, nem todas as células expressavam os quatro

factores, o que demonstra uma baixa frequência de derivação. Podendo, ainda, ocorrer silenciamento ou fusão com genes endógenos (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Em consequência da utilização dos retrovírus podem obter-se células iPS classe I. Estas células vão ter as modificações epigenéticas reiniciadas. Porém vão expressar os transgenes virais e os genes de pluripotência endógenos. As células iPS classe II são, assim, as que sofreram reprogramação completa, onde ocorre o silenciamento retroviral, sendo estas as que mais se assemelham às células ES (Figura 7). O silenciamento retroviral é um marcador do estado pluripotência totalmente reprogramado (Hotta & Ellis, 2008).

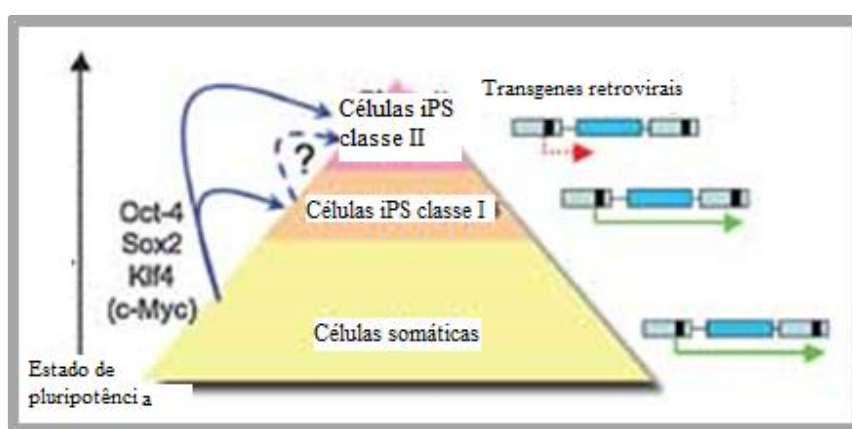


Figura 7: Reprogramação de células somáticas em células iPS utilizando retrovírus contendo quatro FT (Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc).

Retirido de Hotta & Ellis, 2008

Quanto aos lentivírus, estes apresentam uma eficiência razoável, tal como os retrovírus. Contudo estes podem ser aplicados, quer em células em divisão, quer a células quiescentes. Todavia as desvantagens atrás descritas para o outro vector mantêm-se salientando a integração genómica e a silenciamento pró- viral incompleto (Brambrink et al., 2008; Sommer et al., 2009). Considerando os adenovírus como um vector, estes apresentam uma eficiência muito baixa, no entanto não apresentaram integração genómica (Stadtfield, Nagaya, Utikal, Weir, & Hochedlinger, 2008).

Devido às limitações dos vectores descritos, nos trabalhos recentes se geram células iPS utilizando plasmídeos, vírus Sendai, mRNA ou ainda proteínas recombinantes, com o intuito de melhorar os resultados.

O vírus Sendai é um vector de vírus RNA, que não apresenta risco de integração no genoma do hospedeiro (Fusaki, Ban, Nishiyama, Saeki, & Hasegawa, 2009). Quando os vírus são utilizados como vectores, não é necessário proceder à remoção, visto se diluem aos poucos durante as divisões celulares. Os vírus Sendai podem ainda ser removidos com a utilização de anticorpos específicos (Fusaki et al., 2009).

Adicionalmente, a utilização de plasmídeos ainda apresenta uma integração genómica ocasional e a sua eficiência é baixa, podendo ser comparável à dos adenovírus, porém é uma abordagem simples e altamente acessível (Si-Tayeb et al., 2010).

O uso de proteínas permite a ausência de integração genómica e de complicações relacionadas com o DNA. Contudo, é um processo demorado e ineficiente e ainda requer uma maior optimização (D. Kim et al., 2009).

O mRNA, quando empregue como vector apresenta uma ausência de integração genómica. É um processo rápido, de eficiência alta e bem controlável, não obstante a requerer múltiplas repetições de transfecção (Warren et al., 2010).

De mesmo modo, o microRNA é eficiente, a cinética de reprogramação é rápida, não apresenta factores de transcrição exógenos e não apresenta risco de integração. Todavia a sua eficiência é mais baixa, quando comparada com os outros métodos (Yoo et al., 2011).

Alguns microRNA têm certas características específicas, como o miR-302, uma vez que, expressa dois genes supressores de tumores associados à senescência o p16INK4a e o p14Arf. Genericamente estes conseguem controlar a tumorigenicidades e melhorar a segurança no uso terapêutico (Lin & Ying, 2013).

O DNA minicircular é também uma técnica de reprogramação celular, onde é apenas utilizado um vector. Tem uma elevada eficiência de transfecção e expressão (Jia et al., 2010). Este vector é livre de DNA bacteriano e tem uma elevada expressão em células de mamíferos (K. H. Narsinh et al., 2011). Em comparação com os plasmídeos, este apresenta uma melhor eficiência de transfecção e expressão ectópica, visto ter uma menor activação dos mecanismos de silenciamento exógeno (Chen, He, & Kay, 2005).

As técnicas de produção são bastante importantes e já muito melhoradas e evoluídas. Vários dos métodos descritos são muito completos e bastante seguros, todavia existem

ainda limitações associadas. As limitações que cada método acarreta vão ter consequências na sua utilização clínica. O método deve ser escolhido conforme o tipo de células que se pretende obter como produto final, bem como a sua posterior aplicação clínica. O panorama ideal seria a criação de protocolos standard, de modo à reprogramação ser totalmente fiável, reproduzível, acessível e acima de tudo segura.



#### 4 APLICAÇÃO DAS CÉLULAS iPS

Segundo a Organização Mundial de Saúde, tem-se verificado um aumento de dezassete por cento na taxa de mortalidade por doenças crónicas, especialmente de doenças ao nível do sistema cardiovascular, neural e metabólico, entre dois mil e cinco e dois mil e quinze. Facto que torna as células iPS cada vez mais promissoras.

A tecnologia das células iPS está ainda em curso, sendo até este momento considerado um capítulo por descobrir. Os progressos ao nível da produção com maior eficácia, a redução do potencial imunogénico e carcinogénico, têm sido bastante explorados de modo a melhorar as futuras aplicações clínicas, bem como aumentar a segurança da aplicação de tratamentos e pesquisas com células iPS (Diecke, Min Jung, Lee, & Hyeon Ju, 2014).

As células iPS têm aplicações na medicina regenerativa, na modelação de doenças, na descoberta de fármacos mais fiáveis, bem como no estudo da toxicidade de fármacos (Figura 8) (Zhao et al., 2013).

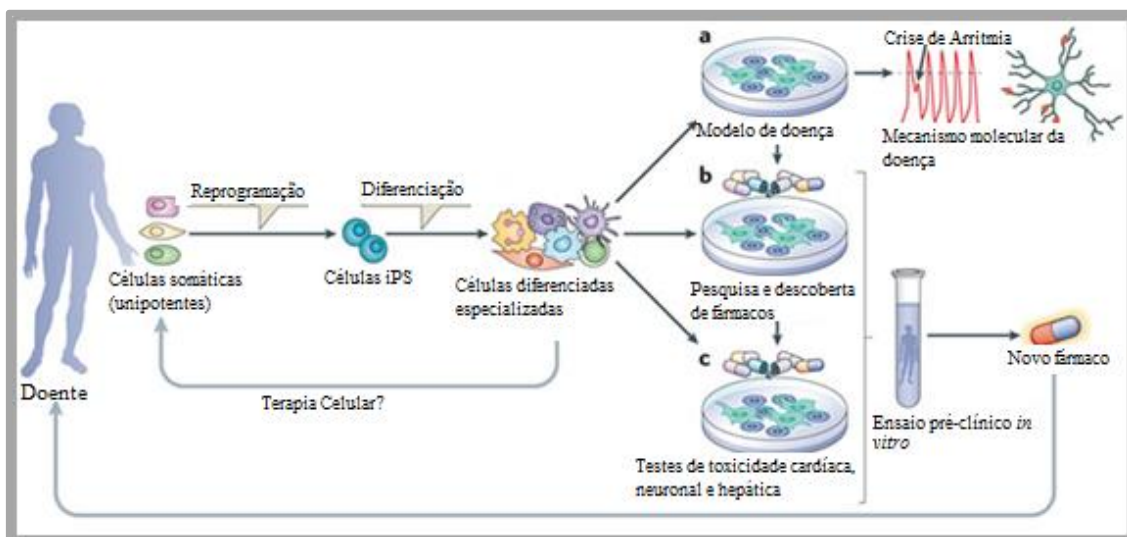


Figura 8: Aplicações das células iPS usando células somáticas de um indivíduo. Assim, utilizando as células somáticas de um paciente ou grupo de pacientes, estas podem ser reprogramadas, obtendo células iPS. Posteriormente, estas células podem ser diferenciadas *in vitro* passando a serem especializadas. A partir do momento em que são células especializadas podem ter várias aplicações como em modelos de doenças, para estudar o mecanismo molecular da doença, como por exemplo em arritmias. Também podem servir para pesquisa de fármacos e para a descoberta de novos compostos terapêuticos. Podem ainda ser importantes em testes de toxicidade. Estas células podem estar implicadas na descoberta de fármacos para o tratamento mais adequado para um doente, tendo em conta as suas características intrínsecas.

Retirado de Bellin, Marchetto, Gage, & Mummery, 2012

As células iPS são também relevantes quando as células que se pretende são em número insuficiente ou de difícil acesso no organismo (Unternaehrer & Daley, 2011).

Estas células conseguem ser únicas no desenvolvimento *in vitro* dos rastreiros de fármacos, de modo a avaliar o potencial terapêutico mas também para explorar as alterações de genes para posterior reparação. Nos últimos anos tem havido um aumento dos estudos sobre a aplicação destas células suportado pelas tecnologias inovadoras que estão cada vez mais melhoradas (Robinton & Daley, 2012).

#### 4.1 MODELOS DE DOENÇAS COM CÉLULAS iPS

A possibilidade de modelar uma doença *in vitro* apenas se tornou possível com a utilização das células iPS, devido à sua semelhança com as células ES. Dada a sua capacidade de auto-renovação contínua e o potencial para originar todo o tipo de células, estas permitem formar um reservatório ilimitado de células (Chun, Byun, & Lee, 2011).

Os modelos de doenças utilizando células iPS veio contornar vários problemas que até então eram um obstáculo ao tratamento de doentes pelos métodos convencionais. Estas células podem ser geradas a partir de um doente com uma doença genética, o que confere ao futuro modelo de doença precisamente as mesmas características do dador. Como a genética pode influenciar a progressão da doença, bem como a resposta a fármacos, utilizando esta técnica consegue-se eliminar estas variáveis. Assim, o uso das células iPS para a construção de modelos de doenças permite a correcção das lesões associadas a doenças genéticas (Young et al, 2012). Também é possível a criação de modelos para uma determinada doença genética em geral, através da construção de um modelo que represente os portadores em geral, podendo ser usados em diversas investigações posteriores.

Até então o uso de métodos clássicos apresentava alguns obstáculos, destacando-se os seguintes:

- A dificuldade em obter amostras de células, quer pela pequena quantidade, quer pelo lugar anatómico onde se encontram, como por exemplo amostras de células do coração ou do cérebro;
- As condições de expansão e armazenamento das células isoladas, após serem obtidas por outros métodos, são específicas e difíceis de criar, de modo a se manter as características celulares necessárias;
- A utilização de modelos celulares animais implica ter em conta a dicotomia semelhanças/diferenças entre a fisiologia humana e a do animal em estudo;
- Os modelos de cultura de células heterólogas embora sejam considerados convenientes e de fácil acesso, não apresentam as características biológicas, físicas e fisiológicas do doente (Young, 2012).

Para a modelação de doenças humanas é necessário considerar a doença, de modo a conseguir pré-definir o desenlace. Em termos genéricos, as doenças que apresentam



maior êxito para a modelação são as doenças genéticas, realçando-se as monogénicas (Tabela 1), ou as doenças congénitas ou familiares. Em contrapartida as doenças esporádicas ou aquelas causadas por factores epigenéticos ou ambientais não apresentam um desfecho tão favorável (Young et al, 2012). Contudo, existem estudos que mostram ser possível a modelação de doenças complexas, como a Alzheimer (Israel et al., 2012) e a Esquizofrenia (Brennand et al., 2011), o que indica que a construção de modelos celulares humanos pode então ser aplicada a uma diversidade de doenças.

As patologias associadas a défices de proteínas são também possíveis de modelar *in vitro*, particularmente as que são detectáveis por imunofluorescência, como a atrofia espinhal muscular, a disautonomia familiar e a distrofia muscular (Grskovic, Javaherian, Strulovici, & Daley, 2011).

Associadas a esta técnica descrevem-se várias doenças na Tabela 1.

Tabela 1: Modelos de doença publicados recorrendo à tecnologia das células iPS

Adaptado de Ebert, Liang, & Wu, 2012

Tipo de doença	Doença	Causa Genética	Tipo de Células geradas	Referência
Hematológica	Anemia Fanconi	Monogénica	Hematócitos	(K. Narsinh, Narsinh, & Wu, 2011)
	Síndrome X frágil	Monogénica	ND	(Adler, Pellizzer, Hareng, Hartung, & Bremer, 2008)
	Talassemia	Monogénica	Células Hematopoiéticas	(Park et al., 2008)
	Síndrome de Down	Monogénica	ND	(Raya et al., 2009)

	Diabetes tipo I	Poligénica	Células produtoras de glucagon e insulina	(Raya et al., 2009)
	Síndrome Swachman-Bodian-Diamond (SBDS)	Monogénica	ND	(Raya et al., 2009)
	Síndrome de Hurler (Mucopolissacaridose tipo I, MPS IH)	Monogénica	Células Hematopoiéticas	(Urbach, Bar-Nur, Daley, & Benvenisty, 2010)
Cardíaca/ Cardiovascular	Síndrome QT I longo	Monogénica	Cardiomiócitos	(Itzhaki et al., 2011)
	Síndrome QT II longo	Monogénica	Cardiomiócitos	(Chamberlain et al., 2010)
	Síndrome de Timothy	Monogénica	Cardiomiócitos	(Moretti et al., 2010)
	Síndrome de Leopardo	Monogénica	Cardiomiócitos	(Brennand et al., 2011)
	Distrofia muscular Duchenne (DMD)	Monogénica	ND	(Outten, Cheng, Gadue, French, & Diamond, 2011; Raya et al., 2009)

	Distrofia muscular Beker (DMB)	Monogénica	ND	(Itskovitz-Eldor et al., 2000; Raya et al., 2009)
	Progeria Hutchinson Gilford (HGPS)	Monogénica	células musculares lisas células estaminais mesenquimais	(Horie, 2012)
Neurológica	Esclerose amiotrófica lateral (ALS)	Poligénica	Neurónios motores e células da glia	(Dimos et al., 2008)
	Doença da Parkinson (PD)	Monogénica	Neurónios dopaminérgicos	(Lee et al., 2009; Soldner et al., 2009)
	Atrofia espinhal muscular (SMA)	Monogénica	Neurónios motores	(Allison D Ebert et al., 2009)
	Doença de Huntington (HD)	Monogénica	ND	(Raya et al., 2009)
	Síndrome de Prader-Willi e Angelman	Monogénica	Neurónios	(Hanna et al., 2007)
	Disautonomia Familiar	Monogénica	Neurónios da crista neural	(Ku et al., 2010)
	Síndrome RETT	Monogénica	Neurónios	(Nguyen et al., 2011)

	Ataxia de Friedreich	Monogénica	ND	(Carvajal-Vergara et al., 2010)
Outras	Síndrome Lesch-Nyhan	Monogénica	ND	(Raya et al., 2009)
	Doença de Gaucher tipo III	Monogénica	ND	(Raya et al., 2009)
	Doença granulomatosa crónica ligada ao cromossoma X	Mongénica	Neutrófilos	(Raya et al., 2009)
	Deficiência de alfa I Antitripsina	Mogénica	Hepatócitos	(Lemonnier et al., 2011)

ND: não determinado

Os modelos de doença vieram então revolucionar as pesquisas feitas pelos investigadores, ao nível dos estudos de mutações, de identificação de vias de sinalização críticas, de teste do potencial de produtos farmacêuticos, substituindo modelos animais ou biopsias (Perkel, 2010).

Apesar de os investigadores terem tido bastante sucesso em gerar estruturas relativamente simples, como a produção de cardiomiócitos, já a elaboração de órgãos completos apresenta mais dificuldades.

Para a construção de um órgão na íntegra é necessário considerar a vasculatura, as redes neurais, de absorção e as células secretoras, entre outros pontos possíveis, dependendo do órgão que se pretende. Estas estruturas podem envolver uma multiplicidade de áreas destacando-se a tecnológica biológica e a engenharia de tecidos, sendo no entanto ainda uma área que requer mais estudo (Perkel, 2010).

## 4.2 PESQUISA DE FÁRMACOS

O controlo dos medicamentos antes da sua entrada no mercado é bastante restrito, havendo uma grande percentagem deles que nunca chega a ser comercializado. Acoplado a este facto, o custo de desenvolvimento de novos fármacos revela-se muito elevado, sem haver uma garantia da sua posterior comercialização.

No desenvolvimento de um novo fármaco, o efeito terapêutico, tais como os efeitos secundários são geralmente testados em animais de laboratório, como ratos, cães e até porcos. Contudo, por existirem diferenças significativas entre os animais e os humanos, estes testes não são efectivamente padronizados (Zhao et al., 2013).

As células iPS podem assim ajudar nos ensaios preliminares, visto permitirem rastreios com um bom rendimento clínico e uma redução de custos. O facto de com estas células ser possível testar a toxicidade e farmacologia, permite e promove o desenvolvimento de novos fármacos. Adicionalmente, torna-se possível investigar um único polimorfismo de nucleótido, que esteja implicado na metabolização e toxicidade de um determinado fármaco. A hepatotoxicidade e a cardiotoxicidade são dois focos principais das falhas que ocorrem nos ensaios pré-clínicos, salientando-se também a variabilidade nas respostas individuais a fármacos que também não podem ser avaliadas através dos métodos convencionais (Chun et al., 2011).

Este novo método, a utilização das células iPS, já foi usado em doentes com atrofia espinal (Allison D Ebert et al., 2009), disautonomia familiar (Lee et al., 2009) e Síndrome de Leopardo (Carvajal-Vergara et al., 2010).

A utilização desta tecnologia como pilar para a descoberta de novos fármacos baseia-se na seguinte sequência de etapas: o recrutamento de doentes; a obtenção de células iPS e armazenamento em biobancos; a diferenciação das células iPS derivadas dos doentes em estudo portadores da doença em investigação; a descoberta do fenótipo da doença e a preparação das condições necessárias ao ensaio atendendo ao fenótipo da doença (Grskovic et al., 2011).

A possibilidade desta nova molécula ser testada em células iPS derivadas do paciente demonstra o seu real potencial terapêutico, visto ter a informação individual do paciente. Este método foi já anteriormente aplicado a outras doenças, tendo sido benéfico para

muitos pacientes (Zhao et al., 2013). A figura 9 ilustra a utilização das células iPS na cardiomiopatia diabética.

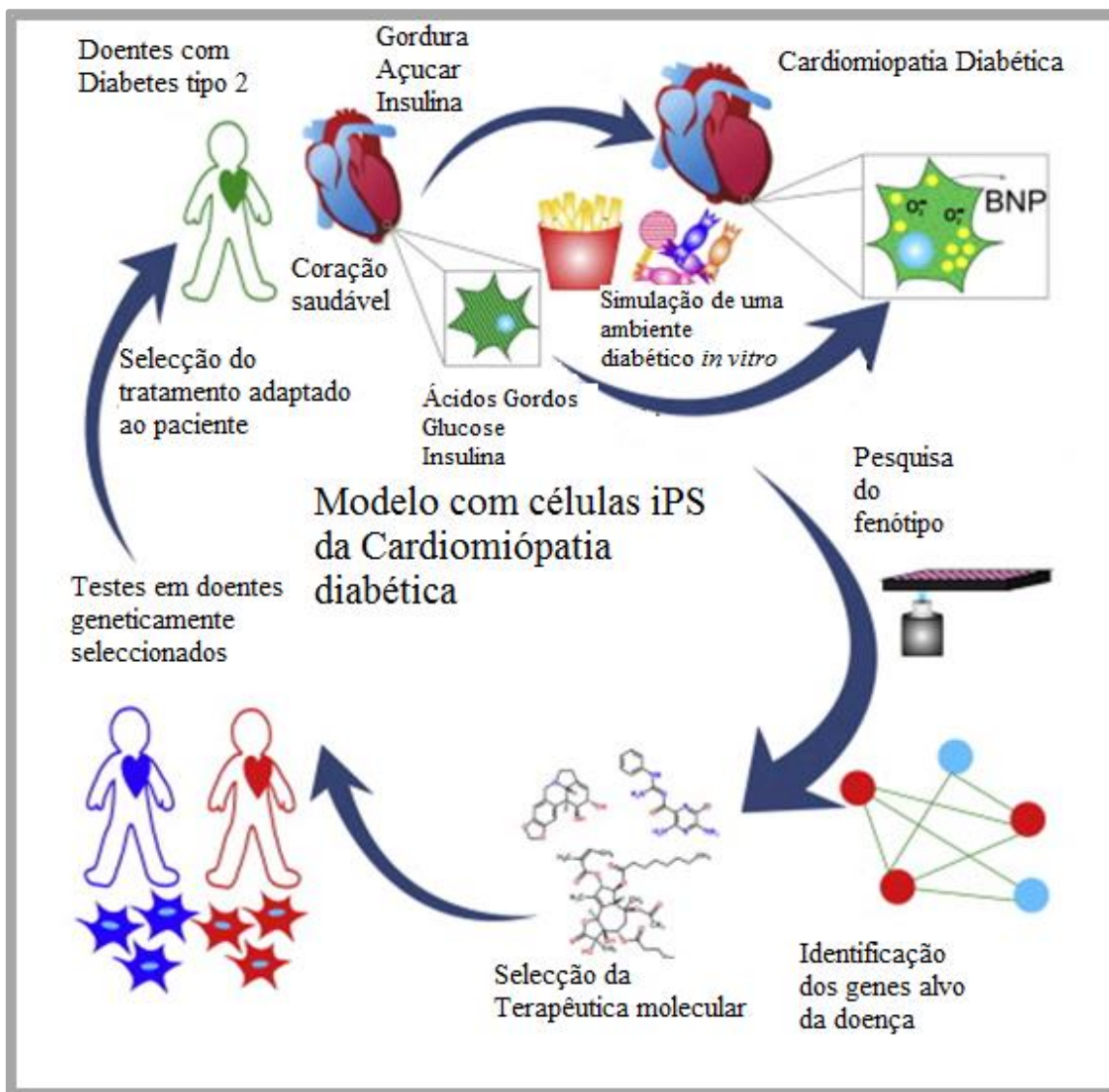


Figura 9: A utilização das células iPS na cardiomiopatia diabética. Criação de um modelo com células iPS, de forma a criar um fenótipo, para a identificação de fármacos, para o tratamento da cardiomiopatia provocada pela diabetes. Exemplifica como se pode descobrir e experimentar estratégias terapêuticas para uma doença. Seleccionam-se doentes, primeiramente, neste caso, cria-se a modelo químico da diabetes, para posteriormente ser feito um fenótipo da cardiomiopatia, observando-se quer desordens estruturais, quer funcionais. São então produzidos os cardiomiócitos dos dois doentes, atendendo à variação da progressão da doença, para posterior investigação e selecção de moléculas terapêuticas mais eficazes.

Adaptado de Drawnel et al., 2014

Quando se recrutam doentes para a recolha de amostras de sangue ou biopsias da pele tem que se garantir a coordenação entre o doente e as instituições onde são acompanhados

e tratados. É necessário integrar o consentimento do doente para o uso das células iPS na descoberta de novos fármacos e a sua possível comercialização. Este consentimento está disponível em Guidelines for Clinical Translation of Stem Cells, onde existem modelos de consentimento documentados que englobam todos os requisitos necessários (Grskovic et al., 2011).

Para a derivação e expansão das células iPS comumente utilizam-se os fibroblastos. Contudo, são também usadas amostras de sangue periférico fresco (Y. H. Loh et al., 2009; Y.-H. Loh et al., 2010) e ainda linfócitos B imortalizados com EBV (Choi et al., 2011; Rajesh et al., 2011).

Apesar das opções acima descritas, para a derivação e expansão das células iPS, os fibroblastos são as células preferencialmente usadas devido às suas características, evidenciando-se aspectos como a acessibilidade, a facilidade de armazenamento e manuseamento, bem como o elevado rendimento na obtenção de iPS. Os fibroblastos podem ser obtidos através da punção da pele com anestesia local, sem recorrer a suturas. O crescimento e expansão das células iPS é tecnicamente exigente e requer especialistas quando comparado com outras células. As condições de reprogramação têm sido progressivamente melhoradas, com o intuito de uniformizar e estabilizar a obtenção destas células (Grskovic et al., 2011).

Atendendo ao conceito das células iPS, as células hiPS podem originar qualquer tipo de células do organismo adulto. Não obstante, os protocolos de diferenciação *in vitro* têm sido desenvolvidos apenas de em tipos celulares específicos, como neurónios, células progenitoras hematopoiéticas, hepatócitos, cardiomiócitos e queratinócitos. Tendo em conta estes protocolos desenvolvidos, todos eles produzem populações de células diferentes e/ou heterogêneas, visto que as células obtidas podem apresentar estádios de maturação diferentes. Estes resultados tem por base o conhecimento incompleto do desenvolvimento embrionário humano, bem como o elevado tempo necessário à produção das células estaminais pluripotêntes humanas e aos seus derivados. Adicionalmente, é de referir a dificuldade da diferenciação das células iPS em larga escala, por exemplo, para a pesquisa de fármacos. Os bancos de células iPS têm sido desenvolvidos de modo a permitir reduzir o tempo de preparação das células, assim como obter preparações celulares para uma panóplia de estudos e investigações (Grskovic et al., 2011). As populações puras das células diferenciadas podem ser obtidas por

enriquecimento, utilizando a separação de células activada por fluorescência (FACS) ou separação com esférulas magnéticas (Young, 2012).



#### 4.3 TERAPIAS CELULARES

A utilização de células iPS no ramo das terapias celulares veio impulsionar a possibilidade de obter células e tecidos imunocompatíveis para transplantes autólogos, visto ser possível criar iPS específicas do doente (Robinton & Daley, 2012).

Através da reprogramação das células do próprio doente, é possível corrigir defeitos genéticos, reparando as células e retornando como células saudáveis de volta ao doente (Cherry & Daley, 2013).

A medicina regenerativa é um dos tópicos mais promissores quando se pensa em células iPS, visto esta tecnologia permitir a substituição das zonas lesadas de um determinado tecido ou órgão, tornando-o novamente funcional. O facto de não haver resposta imunológica confere-lhe uma grande vantagem em relação aos métodos convencionais.

A rejeição imunológica constitui sempre o grande problema dos transplantes de órgãos e das terapias celulares, sendo que o tratamento com fármacos imunossupressores o resto da vida do doente pode produzir efeitos secundários graves e reduzir a sua qualidade de vida. As células iPS vieram, então, permitir resolver a questão da rejeição imunológica.

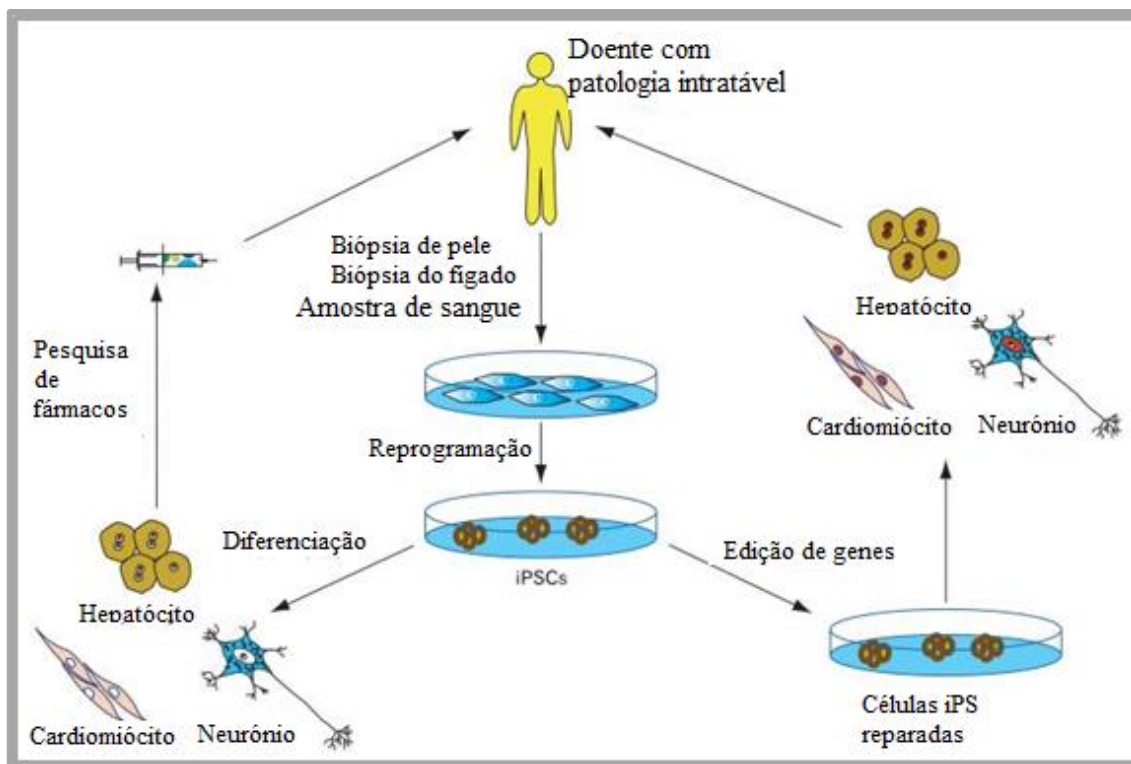


Figura 10: As aplicações das células iPS, nomeadamente a terapia de reposição celular com células derivadas das iPS. As mutações genéticas podem ser corrigidas através da abordagem da terapia genética, antes ou após a reprogramação, produzindo células ausentes de mutações, capazes de ser recolocadas no organismo.

Adaptado de Chun et al., 2011.

Adicionalmente a esta vantagem é também possível reparar mutações causadoras de doenças, através do restauro dos genes alvo nas células iPS específicas do doente (Figura 10) (Zhao et al., 2013).

Em 2007, Hanna et al., utilizaram um modelo de ratinho, no qual se demonstrou que as células iPS podem ser utilizadas na cura da anemia falciforme. Esta é uma doença genética do sangue em que os glóbulos vermelhos não são funcionais. É uma doença causada por uma mutação. Assim, foi possível reparar as células iPS oriundas do modelo do ratinho, obtendo-se células progenitoras reparadas. Estas células foram transplantadas no rato anémico, onde proliferaram e formaram glóbulos vermelhos aptos, revertendo-se assim a doença (Figura 11).

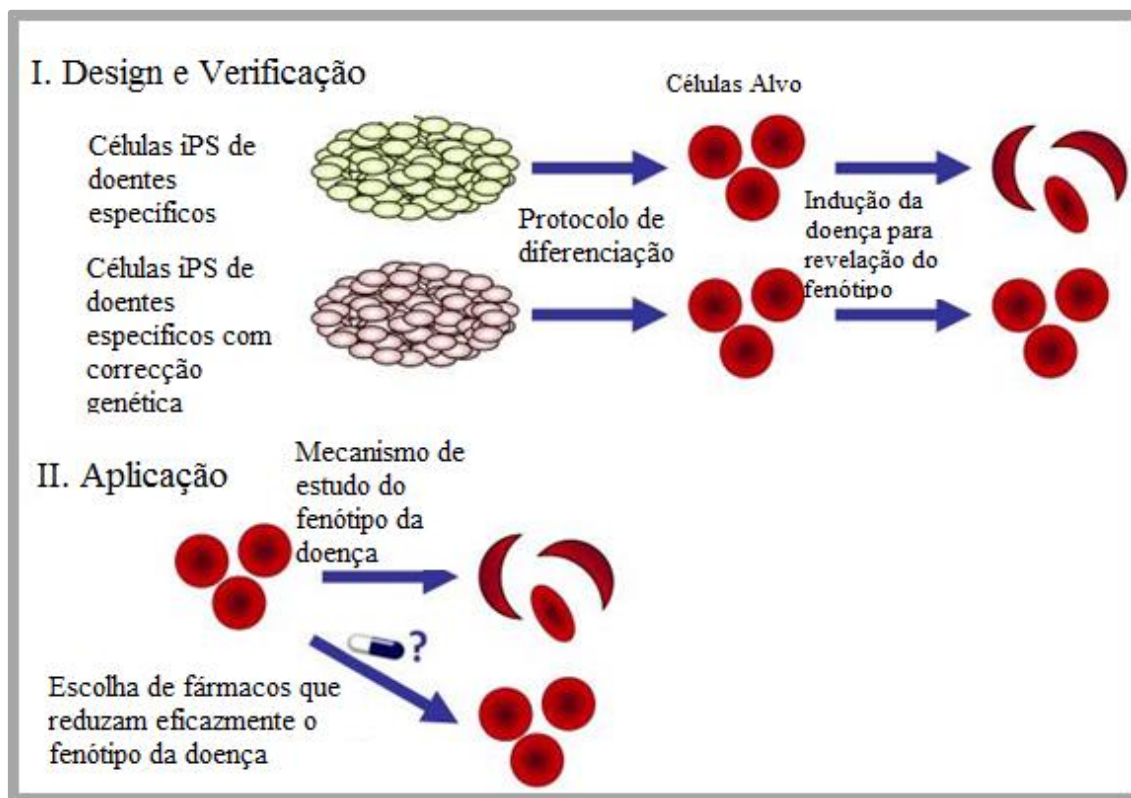


Figura 11: Uso das células iPS no tratamento da Anemia Falciforme.

Adaptado de (Cherry & Daley, 2013)

Apesar dos significativos avanços científicos no mundo da medicina regenerativa, existem ainda algumas limitações de ordem técnica, tanto ao nível do desenvolvimento de métodos seguros e eficazes para a geração destas células, como também ao nível da escolha do tipo de célula mais conveniente para a reprogramação (Zhao et al., 2013). Contudo, é sempre necessário ter presente o aspecto ético da questão.

A distrofia muscular Duchenne (DMD) é uma doença degenerativa muscular grave que é causada por uma mutação que provoca uma perda da função do gene da distrofina, que se localiza no cromossoma X. O gene da distrofina é um dos maiores, tendo 79 exões (Pichavant et al., 2011).

A distrofina tem um papel muito importante, visto actuar como o elo de ligação entre o citoesqueleto interno e a matriz extracelular (Fairclough, Wood, & Davies, 2013). Esta é uma doença para a qual são procurados tratamentos, surgindo a questão: será que deve ser criado um modelo de doença humana ou se deve utilizar as células do próprio doente para uma terapia personalizada.

Em 2015, uma equipa de investigadores propôs que o tratamento assentasse na correção genética das células iPS derivadas do paciente por terapia genética com nucleases TALENS ou CRISPR-Cas 9, que são técnicas com uma eficácia semelhante. Contudo, a segurança de um tratamento com nucleases deve ser calculada antecipadamente. As nucleases programáveis que são utilizadas para a edição de genoma, podem, no entanto, constituir uma abordagem ideal para a correção de mutações como a da distrofina (Li et al., 2015).

Estas técnicas de edição de genoma permitem, assim, a engenharia reversa sistemática das variações genéticas causais, permitindo ainda modificações selectivas de elementos genéticos individuais (Cong et al., 2013).

O desenvolvimento de nucleases programadas é uma ferramenta para as modificações de sequências genómicas alvo, entre as quais se destacam TALEN (Hockemeyer et al., 2011) e o CRISPR-Cas9 (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013), podendo, também, ser utilizadas meganucleases ou ZFNs.

Essencialmente, estas técnicas baseiam-se na elaboração de nucleases que reconhecem e clivam apenas o local escolhido, por exemplo, o local da mutação causadora da doença genética. Para corrigir a mutação, introduz-se nas células simultaneamente com a nuclease o DNA com a sequência corrigida. A clivagem pela nuclease induz a reparação do DNA no local, que se efectua com base na sequência corrigida, pelo mecanismo de recombinação homóloga, HDR (“homology-directed repair”). Para se alcançar um efeito terapêutico com células iPS geneticamente corrigidas numa abordagem terapêutica de um gene autólogo *ex vivo*, é necessário os investigadores ultrapassarem o obstáculo do transplante das células miogénicas obtidas pelas células iPS, sendo este bem sucedido (Li et al., 2015).

A utilização de nucleases já foi relatada no âmbito do tratamento de outras doenças genéticas, com o recurso a correção de mutações, tais como a deficiência de  $\alpha$ 1-antitripsina e a  $\beta$ -talassemia (Ma et al., 2013), entre outras.



## 5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Atendendo ao facto de que para muitos profissionais de saúde e investigadores, a capacidade de desenvolver o tratamento certo para um doente continua a ser uma arte, cada vez se valoriza mais a inter-individualidade e consequentemente a capacidade de adaptar um diagnóstico, prognóstico e tratamento a um indivíduo específico.

A evolução científica tem vindo a explorar a tecnologia das células iPS no âmbito da medicina regenerativa, da terapia celular, da pesquisa de fármacos e ainda muitos modelos de doenças genéticas, tal como o início dos ensaios clínicos (Figura 12). O facto da área da genética ter tido avanços significativos e da tecnologia actualmente disponível permitir análises detalhadas da genética de um indivíduo, serve também como base para os projectos com estas células e para a panóplia de possíveis tratamentos que advém da interligação destas áreas. Através do recurso a estes modelos, tanto a análise de fármacos bem como os seus efeitos terapêuticos e secundários possíveis, podem colocar de parte os testes com animais, que continuam a ter divergências significativas na extrapolação de resultados para os humanos.

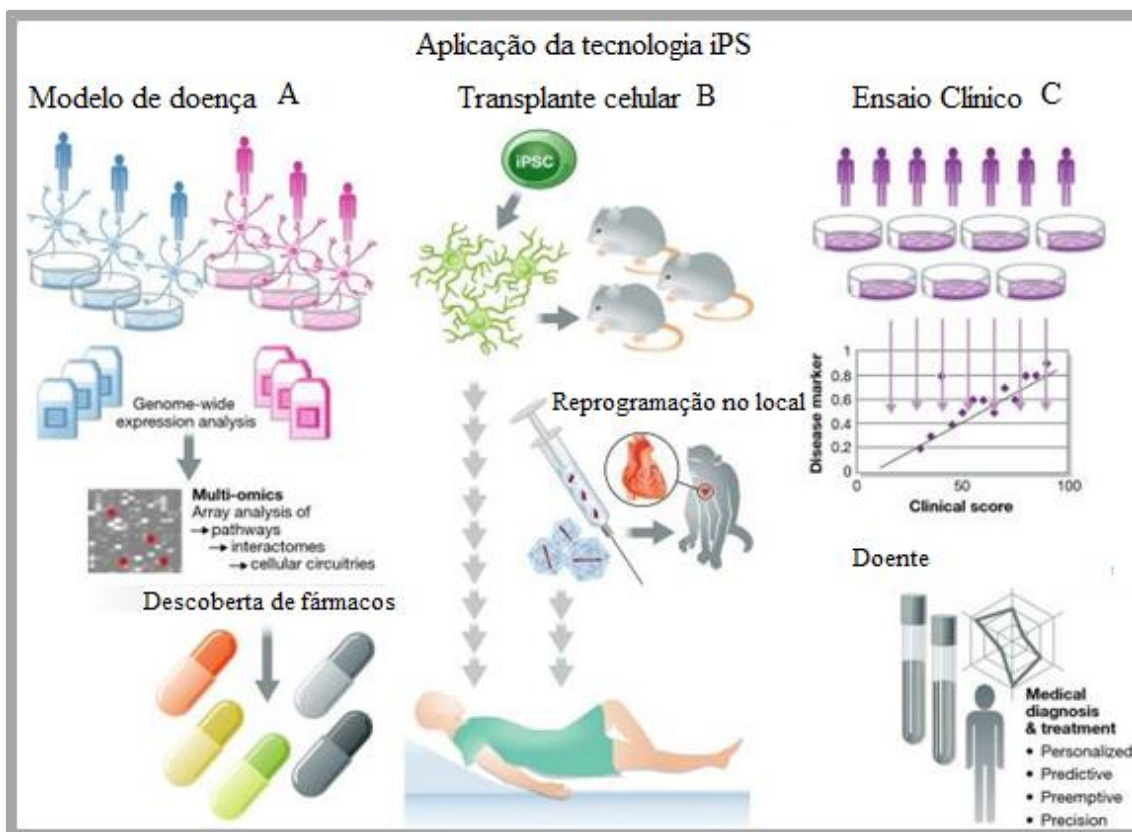


Figura 12: Aplicações da tecnologia das células iPS onde se pode esperar maior impacto. A- representa os modelos de doença e a descoberta de novos fármacos. B- mostra o transplante de células e reprogramação local. C- População para ensaio clínico e estratificação de paciente.

Adaptado de Inoue, Nagata, Kurokawa, & Yamanaka, 2014

Independentemente do notável progresso, desde a geração das células iPS por Yamanaka, existem ainda diversos obstáculos a superar antes que a sua aplicação clínica se torne uma realidade empírica.

A possibilidade de criação de modelos de doenças pode ser desenvolvida para a doença em geral. Por exemplo, uma doença genética para um indivíduo ser portador tem de ter determinada alteração genómica, daí que o modelo não vá ser específico para aquele doente, mas abrangente aos portadores da doença em causa. Assim, ainda existe uma dualidade entre a medicina personalizada e a medicina baseada na doença. A medicina personalizada apesar de ser bastante mais vantajosa para o doente, não pode ser considerada a melhor, isto porque é necessário perceber que cada caso é um caso, devendo o tratamento de cada indivíduo ser discutido com profissionais das diferentes áreas, pesando os prós e os contras.

A medicina personalizada, por exemplo no âmbito terapias de substituição celular, é importante e substitui o tratamento prolongado com terapêutica imunossupressora bem como diminui a probabilidade de rejeição, tornando possível a correção do alelo da doença para garantir um ambiente fisiologicamente adequado. Assume-se como uma medicina completamente única, uma evolução científica brilhante. No entanto, a simulação da doença é bastante importante para a pesquisa de fármacos e, em determinadas situações a vantagem de descobrir qual o melhor tratamento é suficiente para a melhoria do bem-estar do doente. Em termos económicos a medicina personalizada é muito mais dispendiosa, exigindo pessoal qualificado de diferentes áreas para um só caso.

Os estudos que avaliam a equivalência dos diferentes tipos de células iPS são aguardados com expectativa, visto serem um passo muito importante para que possa ser feita a sua aplicação clínica. Adicionalmente, a extensa caracterização de funcionalidade das células iPS derivadas e a sua equivalência funcional *in vivo* implica também de um grande estudo de demonstração (Chun et al., 2011).

O caminho que leva à eficiência de populações puras e funcionais revela-se uma área de que implica muita pesquisa (Chun et al., 2011).

Os protocolos do processo de derivação não se encontram padronizados, não havendo ainda um consenso sobre o protocolo ideal para a derivação destas células. O aumento da eficiência da reprogramação, bem como o facto da reprogramação não provocar modificações genéticas nas células é também um objectivo. A uniformização dos protocolos é assim um passo importante para um controlo rigoroso. Se os diversos laboratórios seguissem um mesmo protocolo, criar-se-iam linhas celulares padronizadas que poderiam ser usadas com mais confiança (Robinton & Daley, 2012).

Na generalidade, os investigadores concordam com a padronização da análise molecular para assegurar se as células reprogramadas estão aptas. As células iPS estão sujeitas à adaptação aos meios de cultura, o que pode afectar o cariótipo destas células (Harrison, Baker, & Andrews, 2007). Dai que seja importante criar protocolos que mimetizem o tempo de cultura de forma a reduzir o tempo de exposição ao meio. Em adição é necessário avaliar as linhas celulares utilizadas em aplicações clínicas de modo a garantir que não existem culturas com aberrações cromosómicas. Neste passo serão analisadas as



células somáticas da mesma maneira que as células reprogramadas e diferenciadas. É igualmente necessário compreender as alterações genómicas que podem acontecer durante todo o processo (reprogramação, cultura e diferenciação), tal como minimizar eventuais aberrações. Ainda com vista a um controlo rigoroso da produção de células iPS, têm sido considerados necessários e prioritários a criação de marcadores de pluripotência mais rigorosos e ensaios de eficiência de diferenciação numa determinada linhagem (Robinton & Daley, 2012).

A criação de plataformas com células iPS humanos seria uma grande vantagem para o estudo de patologias, para a avaliação do potencial terapêutico de determinados fármacos, bem como para servir de fonte sustentável para a medicina regenerativa (Gao, Peng, Deng, & Qing, 2013).

Contudo, permanecem ainda vários pontos por explorar. As células estaminais têm a capacidade de puderem ser transplantadas em laboratório, porém não há garantias de que isso possa acontecer *in vivo*. Existem ainda outras incógnitas, destacando-se o facto de como é que a injeção de células iPS nos modelos de doença pode promover a reparação de tecidos? E como é que estas células se diferenciam em linhas celulares específicas, no cérebro depois do transplante (Gao et al., 2013)?

O progresso das células iPS e das tecnologias associadas é aguardado com expectativa para gerar novos critérios para a estratificação dos doentes e para a regulamentação dos ensaios clínicos com base na capacidade de resposta a fármacos (Inoue, Nagata, Kurokawa, & Yamanaka, 2014).

A tecnologia das células iPS possibilitou a geração de uma fonte celular continua para testes de toxicidade. Esta possível aplicação seria o primeiro passo no tópico dos ensaios clínicos. Se eficiente e viável usar estas células numa fase inicial do ensaio, contudo existem algumas limitações à origem celular, destacando-se a possível obtenção de fenótipos totalmente maduros (Inoue et al., 2014).

Ensaio de toxicidade hepática e cardiovascular estão numa fase inicial de teste (figura 13) (Scott, Peters, & Dragan, 2013). Os resultados destes estudos mostram que substâncias tóxicas já conhecidas, isto é, que têm um mecanismo de acção delineado, devem ser testadas em células iPS e os protocolos de diferenciação das células iPS padrão devem ser criados com base nestes resultados (Inoue et al., 2014).

Devido ao envelhecimento da sociedade, a procura de soluções para a doença de Alzheimer tem sido crescente. A análise de células neurais derivadas de células iPS de doentes com Alzheimer permitiu compreender que a doença devia ser reclassificada com sub-tipos diferentes, visto que existem subgrupos entre as células afectadas. Esta descoberta possibilita a percepção de que a resposta a fármacos deve ser testada utilizando os sub-tipos da doença (Figura 13) (Kondo et al., 2013).

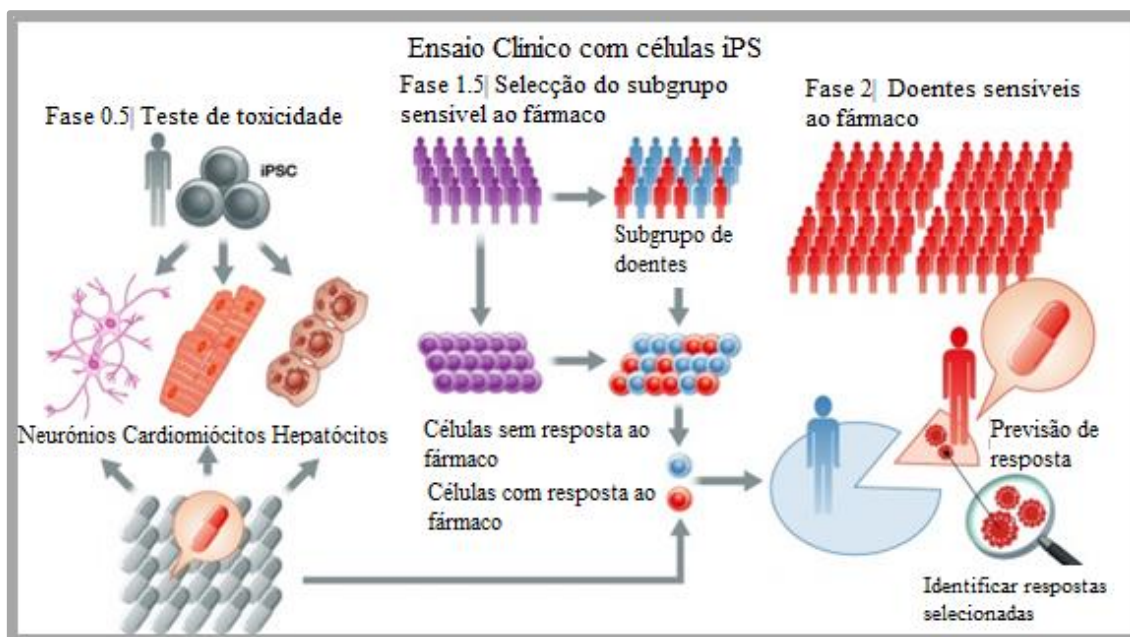


Figura 13: Aplicação das células iPS em três fases diferentes de ensaios clínicos. Numa fase inicial estas células podem servir para os testes de toxicidade. Numa fase seguinte, é então possível a identificação de um subgrupo de doentes com uma doença específica sensível ao fármaco. Numa fase final, utilizando os dados que foram conseguidos, o ensaio pode ser mais preciso e vai apenas utilizar doentes com resposta ao fármaco.

Adaptado de Inoue, Nagata, Kurokawa, & Yamanaka, 2014

Esta tecnologia está na vanguarda da medicina de precisão (Mirnezami, Nicholson, & Darzi, 2012), bem como da possibilidade de um diagnóstico, prognóstico e tratamento personalizado e altamente eficaz. Perspectiva-se que os benefícios possíveis de alcançar com estas células nas diversas aplicações sejam inimagináveis, sendo necessário ultrapassar as dificuldades e as divergências ainda existentes.



## 6 CONCLUSÃO

A reprogramação celular veio criar um utensílio promissor na comunidade científica. A descoberta do Yamanaka surpreendeu com a sua conclusão sobre a capacidade de reprogramação de células, utilizando apenas um cocktail de FTs, com capacidade para redirecionar a identidade celular especializada, o que o que demonstrou a flexibilidade celular, surgindo assim as células iPS, induced Pluripotent stem cells.

Os estudos com estas células estão disseminados pela comunidade científica, porém constituem apenas o início de um longo caminho para o aperfeiçoamento das possíveis terapias de doenças degenerativas e com terminação da vida.

As possíveis aplicações destas células, devido às suas capacidades de auto-renovação ilimitada e diferenciação celular, teoricamente, em todo o tipo de células adquirindo características muito semelhantes às células estaminais embrionárias; a capacidade de pluripotência, são de maior impacto na construção de modelos de doença, medicina regenerativa, substituição de tecidos, pesquisa de fármacos, utilização em ensaios clínicos e estratificação de paciente. O uso em condições autólogas dispensa a necessidade de imunossupressão e contorna o problema das rejeições, visto as células utilizadas poderem ser do próprio doente.

No entanto, os obstáculos foram surgindo e a dificuldade de produção em grande escala, bem como a tendência para formar tumores quando transplantadas, a falta de homogeneidade dos protocolos, o elevado tempo necessário para a produção completa são ainda etapas a ultrapassar.

Subsistem questões éticas e sociais em torno das células tronco-embrionárias, tendo muitos países restrições impostas pelos governos para investigação e produção de linhagens. Todavia, as células iPS vieram oferecer uma oportunidade de contornar as questões e avançar com as pesquisas e as suas posteriores aplicações.

São consensuais os potenciais benefícios das células iPS e a procura de uma panóplia de novas terapias e tratamentos que já estão na mira dos investigadores. Assume-se que para a prática clínica, tenham de ser criados métodos de controlo de segura e eficácia para que as suas aplicações sejam usadas rotineiramente em doenças que até então o tratamento

era apenas paliativo e não curativo ou em doenças consideradas sem cura e potencialmente mortais.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- Adler, S., Pellizzer, C., Hareng, L., Hartung, T., & Bremer, S. (2008). First steps in establishing a developmental toxicity test method based on human embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro*, 22(1), 200–211.
- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., ... Yamanaka, S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5889), 699–702. <http://doi.org/10.1126/science.1154884>
- Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H., & Mummery, C. L. (2012). Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <http://doi.org/10.1038/nrm3448>
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Suh, H., & Jaenisch, R. (2008). Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells. *Cell Stem Cell*, 2(2), 151–159. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2008.01.004>
- Brennand, K. J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., ... Gage, F. H. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 473(7346), 221–225. <http://doi.org/10.1038/nature10603>
- Carvajal-Vergara, X., Sevilla, A., D'Souza, S. L., Ang, Y.-S., Schaniel, C., Lee, D.-F., ... Lemischka, I. R. (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*, 465(7299), 808–812. <http://doi.org/10.1038/nature09005>
- Chamberlain, S. J., Chen, P.-F., Ng, K. Y., Bourgois-Rocha, F., Lemtiri-Chlieh, F., Levine, E. S., & Lalande, M. (2010). Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(41), 17668–17673. <http://doi.org/10.1073/pnas.1004487107>

- Chen, Z.-Y., He, C.-Y., & Kay, M. A. (2005). Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. *Human Gene Therapy*, 16(1), 126–131. <http://doi.org/10.1089/hum.2005.16.126>
- Cherry, A. B. C., & Daley, G. Q. (2013). Reprogrammed cells for disease modeling and regenerative medicine. *Annual Review of Medicine*, 64, 277–90. <http://doi.org/10.1146/annurev-med-050311-163324>
- Choi, S. M., Liu, H., Chaudhari, P., Kim, Y., Cheng, L., Feng, J., ... Jang, Y. Y. (2011). Reprogramming of EBV-immortalized B-lymphocyte cell lines into induced pluripotent Stem cells. *Blood*, 118(7), 1801–1805. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-03-340620>
- Chun, Y. S., Byun, K., & Lee, B. (2011). Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives. *Anatomy & Cell Biology*. <http://doi.org/10.5115/acb.2011.44.4.245>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 819–23. <http://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Daley, G. Q., Lensch, M. W., Jaenisch, R., Meissner, A., Plath, K., & Yamanaka, S. (2009). Broader Implications of Defining Standards for the Pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.009>
- Deng, W., & Xu, Y. (2009). Genome integrity: linking pluripotency and tumorigenicity. *Trends in Genetics*. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2009.09.004>
- Department of Health and Human Services. (2006). Regenerative Medicine. Retrieved August 13, 2015, from [http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative\\_Medicine\\_2006.pdf](http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative_Medicine_2006.pdf)

- Diecke, S., Min Jung, S., Lee, J., & Hyeon Ju, J. (2014). Recent technological updates and clinical applications of induced pluripotent stem cells. *Korean J Intern Med*, 29, 547–557. <http://doi.org/10.3904/kjim.2014.29.5.547>
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., ... Eggan, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5893), 1218–1221. <http://doi.org/10.1126/science.1158799>
- Drawnel, F. M., Boccardo, S., Prummer, M., Delobel, F., Graff, A., Weber, M., ... Iacone, R. (2014). Disease modeling and phenotypic drug screening for diabetic cardiomyopathy using human induced pluripotent stem cells. *Cell Reports*, 9(3), 810–21. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.055>
- Ebert, A. D., Liang, P., & Wu, J. C. (2012). Induced Pluripotent Stem Cells as a Disease Modeling and Drug Screening Platform. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. <http://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318247f642>
- Ebert, A. D., Yu, J., Rose, F. F., Mattis, V. B., Lorson, C. L., Thomson, J. A., & Svendsen, C. N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 457(7227), 277–280. <http://doi.org/10.1038/nature07677>
- Eggleston, K. K. (2012). Stem Cell-Based Therapies: Promises, Obstacles, Discordance, and the Agora. *Perspectives in Biology and Medicine*. <http://doi.org/10.1353/pbm.2012.0001>
- Ellis, J., Bruneau, B. G., Keller, G., Lemischka, I. R., Nagy, A., Rossant, J., ... Stanford, W. L. (2009). Alternative Induced Pluripotent Stem Cell Characterization Criteria for In Vitro Applications. *Cell Stem Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.010>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156. <http://doi.org/10.1038/292154a0>



- Fairclough, R. J., Wood, M. J., & Davies, K. E. (2013). Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nature Reviews. Genetics*, 14(6), 373–8. <http://doi.org/10.1038/nrg3460>
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(8), 348–362. <http://doi.org/10.2183/pjab.85.348>
- Gao, A., Peng, Y., Deng, Y., & Qing, H. (2013). Potential therapeutic applications of differentiated induced pluripotent stem cells (iPSCs) in the treatment of neurodegenerative diseases. *Neuroscience*. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.076>
- Gładych, M., Andrzejewska, A., Oleksiewicz, U., & Estécio, M. R. H. (2015). Review Epigenetic mechanisms of induced pluripotency. *Współczesna Onkologia*. <http://doi.org/10.5114/wo.2014.47135>
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006>
- Greber, B., Lehrach, H., & Adjaye, J. (2007). Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells*, 25, 455–464. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0476>
- Greiner, J. F., Grunwald, L.-M., Müller, J., Sudhoff, H., Widera, D., Kaltschmidt, C., & Kaltschmidt, B. (2014). Culture bag systems for clinical applications of adult human neural crest-derived stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(2), 34. <http://doi.org/10.1186/scrt422>
- Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B., & Daley, G. Q. (2011). Induced pluripotent stem cells--opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(12), 915–29. <http://doi.org/10.1038/nrd3577>

- GURDON, J. B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 10, 622–640. <http://doi.org/10.1002/stem.684>
- Han, G., Wang, H., & Hao, J. (n.d.). Molecular Mechanisms of Embryonic Stem Cell Pluripotency. <http://doi.org/10.5772/54365>
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.-W., Meissner, A., Cassady, J. P., ... Jaenisch, R. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), 1920–1923. <http://doi.org/10.1126/science.1152092>
- Harrison, N. J., Baker, D., & Andrews, P. W. (2007). Culture adaptation of embryonic stem cells echoes germ cell malignancy. *International Journal of Andrology*, 30(4), 275–281. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00762.x>
- Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C. S., Gao, Q., Cassady, J. P., ... Jaenisch, R. (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature Biotechnology*, 29(8), 731–734. <http://doi.org/10.1038/nbt.1927>
- Horie, M. (2012). Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Respiration and Circulation*, 60(5), 483–488. <http://doi.org/10.1038/nature09855>
- Hotta, A., & Ellis, J. (2008). Retroviral vector silencing during iPS cell induction: An epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *Journal of Cellular Biochemistry*. <http://doi.org/10.1002/jcb.21912>
- Inoue, H., Nagata, N., Kurokawa, H., & Yamanaka, S. (2014). iPS cells: a game changer for future medicine. *The EMBO Journal*, 33(5), 409–17. <http://doi.org/10.1002/emboj.201387098>
- Israel, M. A., Yuan, S. H., Bardy, C., Reyna, S. M., Mu, Y., Herrera, C., ... Goldstein, L. S. B. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/nature10821>

- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., ... Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 6(2), 88–95. <http://doi.org/10859025>
- Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., ... Gepstein, L. (2011). Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*, 471(7337), 225–229. <http://doi.org/10.1038/nature09747>
- Jia, F., Wilson, K. D., Sun, N., Gupta, D. M., Huang, M., Li, Z., ... Wu, J. C. (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature Methods*, 7(3), 197–199. <http://doi.org/10.1038/nmeth.1426>
- José Bragança, Á. T. E. J. a. B. (2010). células estaminais e medicina regenerativa Um admirável mundo novo. *canalBQ, Revista Da Sociedade Portuguesa de Bioquímica*, 4–17.
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., ... Kim, K.-S. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 4(6), 472–476. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005>
- Kim, J. B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., ... Schöler, H. R. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 454(7204), 646–650. <http://doi.org/10.1038/nature07061>
- Kleinsmith, L. J., & Pierce, G. B. (1964). Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells of Single Embryonal. *Cancer Research*, 24(9), 1544–1551.
- Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., ... Inoue, H. (2013). Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*, 12(4), 487–496. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.009>

- Ku, S., Soragni, E., Campau, E., Thomas, E. A., Altun, G., Laurent, L. C., ... Gottesfeld, J. M. (2010). Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAATTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell*, 7(5), 631–637. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.09.014>
- Lee, G., Papapetrou, E. P., Kim, H., Chambers, S. M., Tomishima, M. J., Fasano, C. A., ... Studer, L. (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, 461(7262), 402–406. <http://doi.org/10.1038/nature08320>
- Leeper, N. J., Hunter, A. L., & Cooke, J. P. (2010). Stem cell therapy for vascular regeneration: Adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 122(5), 517–526. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.881441>
- Lemonnier, T., Blanchard, S., Toli, D., Roy, E., Bigou, S., Froissart, R., ... Bohl, D. (2011). Modeling neuronal defects associated with a lysosomal disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics*, 20(18), 3653–3666. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddr285>
- Lerou, P. H., & Daley, G. Q. (2005). Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev*, 19(6), 321–331. <http://doi.org/10.1016/j.blre.2005.01.005>
- Lewitzky, M., & Yamanaka, S. (2007). Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Current Opinion in Biotechnology*. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.09.007>
- Li, H. L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., ... Hotta, A. (2015). Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*, 4(1), 143–54. <http://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.10.013>
- Lin, S. L., & Ying, S. Y. (2013). Mechanism and method for generating tumor-free ips cells using intronic microrna mir-302 induction. *Methods in Molecular Biology*, 936, 295–312. <http://doi.org/10.1007/978-1-62703-083-0-23>

- Loh, Y. H., Agarwal, S., Park, I. H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G. C., ... Daley, G. Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*, 113(22), 5476–5479. <http://doi.org/blood-2009-02-204800> [pii]n10.1182/blood-2009-02-204800
- Loh, Y.-H., Hartung, O., Li, H., Guo, C., Sahalie, J. M., Manos, P. D., ... Daley, G. Q. (2010). Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell*, 7(1), 15–19. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.004>
- Ma, N., Liao, B., Zhang, H., Wang, L., Shan, Y., Xue, Y., ... Pan, G. (2013). Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene correction in integration-free  $\beta$ -thalassemia induced pluripotent stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(48), 34671–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.496174>
- Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., & Hochedlinger, K. (2008). A High-Efficiency System for the Generation and Study of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 3(3), 340–345. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.003>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., ... Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 823–6. <http://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), 7634–7638. <http://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- Mirnezami, R., Nicholson, J., & Darzi, A. (2012). Preparing for Precision Medicine. *New England Journal of Medicine*. <http://doi.org/10.1056/NEJMp1114866>
- Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C. B., Lam, J. T., Bott-Flügel, L., ... Laugwitz, K.-L. (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 363(15), 1397–1409. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa0908679>

- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., ... Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*, 26(1), 101–106. <http://doi.org/10.1038/nbt1374>
- Narsinh, K. H., Jia, F., Robbins, R. C., Kay, M. A., Longaker, M. T., & Wu, J. C. (2011). Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nature Protocols*, 6(1), 78–88. <http://doi.org/10.1038/nprot.2010.173>
- Narsinh, K., Narsinh, K. H., & Wu, J. C. (2011). Derivation of human induced pluripotent stem cells for cardiovascular disease modeling. *Circulation Research*, 108(9), 1146–1156. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240374>
- Nguyen, H. N., Byers, B., Cord, B., Shcheglovitov, A., Byrne, J., Gujar, P., ... Pera, R. R. (2011). LRRK2 mutant iPSC-derived da neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell*, 8(3), 267–280. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.013>
- Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), 313–317. <http://doi.org/10.1038/nature05934>
- Outten, J. T., Cheng, X., Gadue, P., French, D. L., & Diamond, S. L. (2011). A high-throughput multiplexed screening assay for optimizing serum-free differentiation protocols of human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*, 6(2), 129–142. <http://doi.org/10.1016/j.scr.2010.11.001>
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., ... Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134(5), 877–886. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.041>
- Perkel, J. (2010). LIFE SCIENCE TECHNOLOGIES. *Science*. <http://doi.org/10.1126/science.328.5975.249>
- Pichavant, C., Aartsma-Rus, A., Clemens, P. R., Davies, K. E., Dickson, G., Takeda, S., ... Tremblay, J. P. (2011). Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic

- approaches to treat DMD. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(5), 830–840. <http://doi.org/10.1038/mt.2011.59>
- Pompe, S., Bader, M., & Tannert, C. (2005). Stem-cell research: the state of the art, 6(4).
- Rajesh, D., Dickerson, S. J., Yu, J., Brown, M. E., Thomson, J. A., & Seay, N. J. (2011). Human lymphoblastoid B-cell lines reprogrammed to EBV-free induced pluripotent stem cells. *Blood*, 118(7), 1797–1800. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-01-332064>
- Raya, A., Rodríguez-Pizà, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M. J., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, 460(7251), 53–59. <http://doi.org/10.1038/nature08129>
- Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/nature10761>
- Scott, C. W., Peters, M. F., & Dragan, Y. P. (2013). Human induced pluripotent stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing. *Toxicology Letters*. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.02.020>
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., ... Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23), 13726–13731. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13726>
- Si-Tayeb, K., Noto, F. K., Sepac, A., Sedlic, F., Bosnjak, Z. J., Lough, J. W., & Duncan, S. A. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Developmental Biology*, 10, 81. <http://doi.org/10.1186/1471-213X-10-81>
- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G. W., Cook, E. G., ... Jaenisch, R. (2009). Parkinson's Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Free of Viral Reprogramming Factors. *Cell*, 136(5), 964–977. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.013>

- Sommer, C. a, Stadtfeld, M., Murphy, G. J., Hochedlinger, K., Kotton, D. N., & Mostoslavsky, G. (2009). Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(3), 543–9. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2008-1075>
- Stadtfeld, M., Brennand, K., & Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Current Biology : CB*, 18(12), 890–894. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2008.05.010>
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., & Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5903), 945–949. <http://doi.org/10.1126/science.1162494>
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., & Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology : Brief Communication*, 11(19), 1553–8.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S., Waknitz, M., Swiergiel, J., Marshall, V., & Jones, J. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145–1147. <http://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Totey, S., Pal, R., Mamidi, M. K., Govindasamy, V., & Totey, S. (2010). Stem Cell Biology and Application. In *Applications of Flow Cytometry in Stem Cell Research and Tissue Regeneration* (pp. 75–89). <http://doi.org/10.1002/9780470631119.ch6>
- Unternaehrer, J. J., & Daley, G. Q. (2011). Induced pluripotent stem cells for modelling human diseases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series*



- B, *Biological Sciences*, 366(1575), 2274–2285.  
<http://doi.org/10.1098/rstb.2011.0017>
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q., & Benvenisty, N. (2010). Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 6(5), 407–411. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.005>
- Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., & Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci*, 122(Pt 19), 3502–3510. <http://doi.org/jcs.054783> [pii]n10.1242/jcs.054783
- Vaskova, E. A., Stekleneva, A. E., Medvedev, S. P., & Zakian, S. M. (2013). “Epigenetic memory” phenomenon in induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae*.
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., ... Rossi, D. J. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7(5), 618–630. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810–813. <http://doi.org/10.1089/clo.2006.0002>
- Xu, R.-H., Chen, X., Li, D. S., Li, R., Addicks, G. C., Glennon, C., ... Thomson, J. a. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nature Biotechnology*, 20(12), 1261–1264. <http://doi.org/10.1038/nbt761>
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., ... Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453(7194), 519–523. <http://doi.org/10.1038/nature06968>
- Yoo, A. S., Sun, A. X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., ... Crabtree, G. R. (2011). MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*, 476(7359), 228–231. <http://doi.org/10.1038/nature10323>

- Young, W. (2012). Patient-specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Platform for Disease Modeling, Drug Discovery and Precision Personalized Medicine. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. <http://doi.org/10.4172/2157-7633.S10-010>
- Yu, J., Chau, K. F., Vodyanik, M. A., Jiang, J., & Jiang, Y. (2011). Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules. *PLoS ONE*, 6(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017557>
- Zhao, J., Jiang, W., Sun, C., Hou, C., Yang, X.-M., & Gao, J. (2013). Induced pluripotent stem cells: origins, applications, and future perspectives. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 14(12), 1059–69. <http://doi.org/10.1631/jzus.B1300215>